



UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Orientação: Dr. Carlos Cardoso

Bruno Marques Miguel

2017



UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE FARMÁCIA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Orientação: Dr. Carlos Cardoso

Bruno Marques Miguel

2017

Agradecimentos

Um especial agradecimento ao Dr. Carlos Cardoso que orientou o meu estágio, pelo apoio, disponibilidade, prontidão de resposta e ensinamentos de excelência.

Aos patologistas clínicos e especialistas em análises clínicas do LJC por terem contribuído para aprofundar e melhorar os meus conhecimentos e competências laboratoriais.

Aos técnicos de análises clínicas e restantes colaboradores do LJC pela disponibilidade.

Aos meus familiares em particular à minha esposa e filha, pela compreensão demonstrada nos momentos em que não estive presente por estar a dedicar esse tempo a este trabalho.

A todos os meus mais sinceros agradecimentos.

Índice

Abreviaturas	1
Índice de Figuras	4
Índice de Tabelas	6
Resumo/Abstract	7

Introdução..... 8

1. Estrutura Organizacional do Laboratório 9

2. Fase Pré-analítica 11

2.1 Preparação do utente 11

2.2 Colheita 11

2.3 Transporte e armazenamento de produtos biológicos 14

2.4 Triagem 14

3. Fase Analítica 16

3.1- Core Laboratorial 16

3.1.1- Hematologia 16

A. Equipamentos, Metodologias e Parâmetros..... 16

i- ADVIA 2120 16

ii- Advia Autoslide Maker 24

iii- Analisador VES-Matic Cube-200 27

iv- Analisador BCS XP System 28

v- Variant II - Biorad 30

vi- Capillarys 2 Flex Percing Sebia 31

vii- Analisador ORTHO AutoVue® Innova System 32

B. Técnicas Manuais 34

i- Teste da falciformação 34

C. Casos Laboratoriais..... 35

3.1.2- <i>Bioquímica Clínica</i>	40
A. Equipamentos, Metodologias e Parâmetros	40
i- ADVIA 2400	40
ii- Autoanalisador de urinas Clinitek Atlas	42
iii- Sysmex UF-1000i	43
iv- Capillarys 2- Sebia	43
v- Hydrasys 2 Focusing	45
B. Casos Laboratoriais	46
3.1.3- <i>Endocrinologia e Imunologia</i>	52
A. Equipamentos, Metodologias e Parâmetros	52
i- ADVIA Centaur	52
ii- IMMULITE 2000	53
iii- cobas e 411	54
B. Técnicas Manuais	55
i- RPR (Rapid Plasma Reagin)	55
ii- Reacção de Paul-Bunnet	55
iii- Antígenos febris	56
C. Casos Laboratoriais	56
3.2- Radioimunoensaio	60
A. Equipamentos, Metodologias e Parâmetros	60
i- Contador de Raios Gama Wallac Wizard 1470 (Perkin Elmer)	60
3.3- Alergologia	61
A. Equipamentos, Metodologias e Parâmetros	61
i- Equipamentos UniCAP 100 e 250	61
3.4- Química Analítica	62
A. Equipamentos, Metodologias e Parâmetros	62
i- Cromatografo de Cromatografia Líquida de Alta Definição (HPLC)	62
ii- Cromatografo de Cromatografia Gasosa com Espectrofotometria de Massa (GC-MS)	64

iii- Espectrofotómetro de Infravermelho Perkin-Elmer FT-IR	65
iv- Espectrofotómetro de Absorção Atômica Shimadzu Modelo AA 6800.....	65
v- Varian Vista MPX- Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma indutivamente Acoplado (ICP OES)	66
vi- HeliFAN- detecção de Helicobacter pylori	67
3.5- Microbiologia	68
A. Equipamentos e Metodologias	68
i- Sysmex UF-1000i	68
ii- Sistema VITEK2.....	68
iii- BacT/ALERT	69
iv- OC Sensor	70
B. Meios de cultura	71
C. Procedimentos analíticos	74
1- Análise microbiológica	74
1.1 <i>Trato Respiratório Superior</i>	74
A- Exsudado Faríngeo/Orofaríngeo	74
A.1- Colheita	74
A.2- Processamento Laboratorial	74
A.3- Valorização dos resultados	74
B- <i>Exsudado Nasal</i>	75
B.1- Colheita	75
B.2- Processamento Laboratorial	75
B.3- Valorização dos resultados	75
1.2 <i>Trato Respiratório Inferior</i>	75
A- Expectoração	75
A.1- Colheita	75
A.2- Processamento Laboratorial	76
A.3- Valorização dos resultados	77

B- Pesquisa de micobactérias	77
B.1- Colheita	77
B.2- Processamento Laboratorial	77
1.3 <i>Trato gastro-intestinal</i>	78
A- Coprocultura	78
A.1- Colheita	78
A.2- Processamento Laboratorial	79
A.3- Valorização dos resultados	79
1.4 <i>Trato Urinário</i>	80
A- Urocultura	80
A.1- Colheita	80
A.2- Processamento Laboratorial	81
A.3- Valorização dos resultados	83
1.5 <i>Trato genital</i>	83
A- Exsudado vaginal	83
A.1- Colheita	83
A.2- Processamento Laboratorial	84
A.3- Valorização dos resultados	85
B- Exsudado uretral (Homem)	86
B.1- Colheita	86
B.2- Processamento Laboratorial	86
B.3- Valorização dos resultados	87
C- Espermocultura	87
C.1- Colheita	87
C.2- Processamento Laboratorial	87
C.3- Valorização dos resultados	88
1.6 <i>Olho</i>	88
A- Exsudado ocular	88
A.1- Colheita	88

A.2- Processamento Laboratorial	88
A.3- Valorização dos resultados	89
1.7 <i>Ouvido</i>	89
A- Exsudado auricular.....	89
A.1- Colheita	89
A.2- Processamento Laboratorial	89
A.3- Valorização dos resultados	89
1.8 <i>Feridas</i>	90
A- Exsudado purulento	90
A.1- Colheita	90
A.2- Processamento Laboratorial	90
A.3- Valorização dos resultados	90
1.9 <i>Sangue</i>	91
A- Hemocultura	91
A.1- Colheita	91
A.2- Processamento Laboratorial	92
A.3- Valorização dos resultados	92
1.9 <i>Fungos</i>	93
A- Exame micológico	93
A.1- Colheita	93
A.2- Processamento Laboratorial	94
A.3- Valorização dos resultados	94
D. Testes de identificação e suscetibilidade a agentes microbianos	95
E. Pesquisa de Beta-lactamases de largo espectro (BLSE)	96
F. Pesquisa de ovos, quistos e parasitas (Técnica da concentração pelo Formol Etil-Acetato).....	97
1- Fundamento	97
2- Valorização de resultados	98
G. Casos Laboratoriais	99

4. Controlo de Qualidade.....	101
4.1 Controlo de Qualidade Interno	102
4.2 Avaliação Externa da Qualidade	106
Conclusão.....	107
Referências Bibliográficas	108

Abreviaturas

Ac(s)- Anticorpo(s)

ACTH-Hormona adrenocorticotrofina

ADA- *American Diabetes Association*

AEQ- Avaliação externa da qualidade

Ag(s)- Antigénio(s)

ALP- Fosfatase alcalina

ALT - Alanina aminotransferase

aPTT- Tempo de tromboplastina parcial activado

AST- Aspartato aminotransferase

ATg- Acs antitiroglobulina

ATPO- Acs antiperoxidase (ATPO)

AVC- Acidente vascular cerebral

BAAR- Bacilos Álcool Ácido Resistentes

BLSE- Beta-lactamases de largo espectro

CAT- Tecnologia de Aglutinação em Coluna

CHGM- Concentração de hemoglobina globular média

CLSI- Clinical & Laboratory Standards Institute

CQ- Controlo de Qualidade

CQA- Controlo de Qualidade Analítico

CQI- Controlo de qualidade interno

CT- Colesterol total

DM- Diabetes *mellitus*

EAA- Espectrofotometria de Absorção Atómica

ECL- Electroquimioluminescência

ECP- Proteína catiónica do eosinófilo

ECZ- Eletroforese capilar de zona

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético

EMSP- Estudo morfológico de sangue periférico

Eta- Erro total máximo admissível

FTA-ABS- *Fluorescent treponemal antibody absorption*

GC- Cromatografia gasosa

GC-MS- Cromatografia Gasosa com Espectrofotometria de Massa

GGT- γ - glutamil transpeptidase

GV- Glóbulos vermelhos

HAV-Vírus da hepatite A

Hb-Hemoglobina (Hb);

HbS - Hemoglobina S

HCV -Vírus da hepatite C

HDL- *High-density lipoprotein*

HGM- Hemoglobina globular média

HIV- Vírus da imunodeficiência humana

HPLC- Cromatografia Líquida de Alta Definição

Ht- Hematócrito

ICP OES- Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma indutivamente Acoplado

Ig's- Imunoglobulinas

INR-Razão Normalizada Internacional

IRMA- Ensaio imunoradiométrico

ISE- Eléttodos seletivos de iões

ITU - Infecção do trato urinário

LC- limites de controlo

LDL - *Low-density lipoprotein*

LEA- Limites de especificação analítica

LJC - Laboratório Dr. Joaquim Chaves

MI- Mononucleose Infecciosa

MPV- Volume plaquetário médio

NICE- *Nacional Institute for Clinical Excellence*

PAI- Anticorpos anti-eritrocitários irregulares

PCR- Proteína C reativa

PCR-HS- PCR de alta sensibilidade

PDW- Coeficiente de variação da distribuição do tamanho das plaquetas

PEG- Polietilenoglicol

PSA - Antígeno específico da próstata

PSOF- Pesquisa de sangue oculto nas fezes

PTH – Paratormona

RBC- Contagem de Eritrócitos

RCV- Risco cardiovascular

RDW- Índice de dispersão eritrocitária;

RIA- Radioimunoensaio

Rpm - Rotações por minuto

RPR- *Rapid Plasma Reagin*

TFG- Taxa de filtração glomerular

TG- Triglicéridos

TP- Tempo de protrombina

TPHA- hemaglutinação para *Treponema pallidum*

TRAb's- Anticorpos antirrecetor da TSH

TSA- Teste de suscetibilidade a agentes antimicrobianos

VCA- Antígeno da cápside viral

VDRL - *Venereal Disease Research Laboratory*

VGM-Volume globular médio;

VSE- Velocidade de sedimentação eritrocitária

WBC- Contagem total de leucócitos

Índice de Figuras

Fig. 1- Sistema Modular Advia Labcell	9
Fig. 2- Sistema de colheita por vácuo BD Vacutainer	12
Fig. 3- Analisador hematológico ADVIA 2120.....	17
Fig. 4- Distribuição dos eritrócitos por volume celular.....	18
Fig. 5- Histograma eritrocitário VGM /Hb Globular.....	18
Fig.6- Histograma da análise de plaquetas.....	19
Fig.7- Histograma PEROX	22
Fig.8- Histograma BASO	23
Fig. 9- Advia Autoslide Maker.....	24
Fig.10- Fundamento da coloração de May-Grunwald-Giemsa.....	24
Fig.11- Esfregaço de sangue periférico corado	25
Fig.12- Analisador VES-Matic Cube-200	27
Fig.13- Método de Westergren modificado	28
Fig.14- Analisador BCS XP System.....	28
Fig.15- Aparelho Variant II.....	30
Fig.16-Cromatograma de hemoglobinas	30
Fig.17- Capillarys 2 Flex Percing Sebia.....	31
Fig.18- Padrão electroforético ECZ de uma amostra de sangue controlo	31
Fig.19- Aparelho ORTHO AutoVue Innova.....	32
Fig.20- Tecnologia CAT.....	32
Fig. 21- ADVIA 2400 Chemistry System.....	40

Fig. 22- CLINITEK Atlas Automated Urine Chemistry Analyzer	42
Fig. 23- Sysmex UF-1000i.....	43
Fig.24- Capillarys 2 Sebia	43
Fig.25- Perfil electroforético- Localização das proteínas separadas	44
Fig.26- Hydrasis 2	45
Fig.27- ADVIA Centaur.....	52
Fig.28- IMMULITE 2000	54
Fig.29- cobas e 411.....	54
Fig.30- Contador Raios Gama Wallac Wizard 1470 (Perkin Elmer)	60
Fig.31- Cromatógrafo utilizado para realização de HPLC	63
Fig.32- Cromatógrafo utilizado para realização de GC-MS	64
Fig.33- Espectrofotômetro de Infravermelho Perkin-Elmer FT-IR	65
Fig.34- Espectrofotômetro de Absorção Atômica Shimadzu Modelo AA 6800.....	66
Fig.35- Varian Vista MPX – ICP/OES	67
Fig.36-HeliFAN.....	67
Fig.37- ViteK 2	69
Fig.38- BacT/ALERT 3D.....	70
Fig.39- OC Sensor- Biogen Diagnóstica.....	71
Fig.40- BAAR a cor vermelha	77
Fig.41- Colônias de M. tuberculosis em meio Lowenstein-Jensen.....	78
Fig.42- Elementos celulares observados a 400x no exame microscópico do sedimento urinário	82
Fig.43- Teste em placa para pesquisa de BLSE.....	97
Fig.44- Cartas de Levey Jennings	103
Fig.45- Diagrama para aprovação da série analítica com base nas regras múltiplas de Westgard.....	105

Índice de Tabelas

Tabela 1- Principais tipos de tubo, anticoagulante, mecanismos de acção, tipo de amostra obtida e uso analítico	13
Tabela 2- Principais critérios para rejeição de amostras.....	15
Tabela 3- Métodos de determinações hematológicas utilizados no aparelho 2120.....	17
Tabela 4 - Razões para realização do estudo morfológico de sangue periférico	26
Tabela 5 - Fundamentos e utilidade das determinações analíticas no aparelho ORTHO AutoVue Innov.....	33
Tabela 6- Meios de cultura sólidos	72
Tabela 7- Meios de cultura líquidos	73
Tabela 8 - Critério de Murray e Washington para a valorização de amostras de expectoração, por observação a baixa ampliação (10x)	76
Tabela 9- Principais testes utilizados para identificação microbiológica	95
Tabela 10- Alguns exemplos de parasitas e suas formas (ovos, quistos e larvas).....	98
Tabela 11- Principais regras de CQ e sua utilidade em laboratório	103

Resumo

O presente relatório de estágio é parte integrante do Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Joaquim Chaves e tem como objetivo descrever a atividade laboratorial desenvolvida, destacando os principais equipamentos, metodologias e parâmetros das várias áreas laboratoriais: bioquímica, hematologia, imunologia, química analítica, radioimunoensaio e microbiologia, assim como outros aspetos mais relevantes no que diz respeito à experiência desenvolvida e o enquadramento dos conhecimentos laboratoriais adquiridos e da sua aplicação à Clínica.

Abstract

This work is part of the Master's degree program in Laboratory Medicine of the Pharmacy School of the University of Lisbon. It was carried out in the Clinical Laboratory Dr. Joaquim Chaves. The aim of this report is describe the laboratory activity and the main equipment, methodologies and laboratory tests of the analytic areas: biochemistry, hematology, immunology, analytical chemistry, radioimmunoassay and microbiology, as well the most relevant aspects regarding the experience developed and the framework of the laboratory knowledge acquired and its application to the Clinic.

Introdução

A medicina laboratorial pode ser definida como a área que conduz e interpreta exames laboratoriais, aplicando metodologias químicas, físicas, imunológicas, morfológicas, genéticas, entre outras, em diversos produtos biológicos para auxílio no diagnóstico clínico e monitorização de patologias (1).

Os principais objetivos do Laboratório de Análises Clínicas/Patologia Clínica na assistência à saúde são: auxílio no diagnóstico ou exclusão de patologias; monitorização da progressão ou regressão de uma doença e da terapêutica; avaliação da gravidade da patologia e definição de prognósticos; contribuição para o diagnóstico precoce ou prevenção no domínio da patologia humana (2).

Estima-se que 70% das decisões clínicas se baseiem em exames laboratoriais e que estes são cada vez mais fundamentais nos novos caminhos que a ciência abriu à medicina (3).

Neste relatório será abordada a organização e funcionamento do Laboratório Dr. Joaquim Chaves, destacando os principais equipamentos, metodologias e parâmetros analíticos das várias áreas laboratoriais: bioquímica, hematologia, imunologia, química analítica, radioimunoensaio e microbiologia. Serão apresentados alguns casos laboratoriais mais representativos da rotina laboratorial e alguns aspetos gerais sobre controlo de qualidade.

1- Estrutura Organizacional do Laboratório

O Laboratório Dr. Joaquim Chaves (LJC) encontra-se dividido em 3 grandes áreas: pré-analítica, analítica e pós-analítica.

A receção, sala de colheitas de produtos biológicos e triagem integram a parte pré-analítica. Depois de efetuada a colheita, nas respetivas salas de colheitas, as amostras biológicas (sangue, urina, expetoração, exsudado vaginal, entre outras) seguem para a zona de triagem onde é feita a verificação da sua integridade e processamento pré-analítico adequado (centrifugação, medições, tratamento com algum produto). A partir da triagem, as amostras seguem para as respetivas áreas analíticas, onde são efetuados os parâmetros laboratoriais. O LJC contém as seguintes áreas analíticas: Core Laboratorial, Química analítica, Radioimunoensaio, Imunologia e autoimunidade, Microbiologia, Biologia Molecular e Genética.

O core laboratorial centraliza o maior volume dos exames laboratoriais solicitados diariamente. Tem uma cadeia de automatização da Siemens, que consiste num Sistema Modular Advia Labcell (Figura 1) composto por um sistema de transporte de amostras, ao qual estão acoplados autoanalisadores da hematologia, química clínica e imunoensaio, permitindo a centralização laboratorial numa única plataforma.

Este tipo de sistema proporciona uma série de vantagens:

- ✓ Gestão de resultados e controlo de qualidade de cada equipamento;
- ✓ Facilidade de operação,
- ✓ Monitorização dos analisadores em tempo real,
- ✓ Acesso permanente às amostras, evitando a interrupção de testes de rotina, garantindo a disponibilização de resultados tão rapidamente quanto possível,
- ✓ Processamento prioritário de determinado tipo de amostras como as urgentes;
- ✓ Controlo de todo o processo a partir de um só terminal;
- ✓ Maior rapidez e eficiência na obtenção de resultados analíticos



Figura 1- Sistema modular Advia Labcell

A fase pós-analítica compreende o processo desde que se obtém o resultado do exame laboratorial até este ser recebido pelo doente ou médico prescritor. É fundamental que o laboratório defina os limites de risco, valores críticos ou de alerta para os analitos cujo resultado necessite de ação médica imediata. É recomendável que comentários relevantes em relação ao teste e/ou resultado sejam adicionados no boletim, com o intuito de auxiliar a interpretação médica (2).

Além do dever de garantir a fiabilidade dos resultados obtidos, é função do Laboratório assegurar que os relatórios com os resultados analíticos são entregues aos destinatários apropriados, evitando interferências com terceiros e garantir a conformidade com a legislação de proteção de dados (4).

O LJC possui um corpo técnico altamente qualificado constituído por patologistas clínicos, farmacêuticos especialistas em análises clínicas e técnicos de análises clínicas e saúde pública que juntamente com a sofisticada tecnologia que dispõem fazem deste Laboratório uma referência nacional de qualidade e rigor.

2- Fase Pré-Analítica

A fase pré-analítica inclui todos os processos que ocorrem a partir do momento em que o médico faz a prescrição dos exames laboratoriais até que a amostra esteja convenientemente preparada para ser analisada (4).

A preparação do doente, colheita e identificação das amostras, transporte, armazenagem e preparação final para a análise são fundamentais nesta fase. Os resultados válidos e fidedignos requerem uma colheita bem efetuada e representativa, uma boa conservação e preparação da amostra (5).

Os estudos têm apontado os factores pré-analíticos como responsáveis por cerca de 70% dos erros em Laboratório Clínico, o que tem feito com que os processos de melhoria contínua da qualidade apostem em mecanismos que garantam a rastreabilidade de todo o processo pré-analítico e se centrem fundamentalmente na utilização de acções preventivas e corretivas desta fase, evitando, tanto quanto possível, que estes fatores possam interferir na qualidade dos resultados produzidos (3,4,6).

2.1 Preparação do utente

A preparação de um utente para a realização de exames laboratoriais requer o controlo de variáveis fisiológicas de forma a minimizar a sua interferência nas determinações analíticas. Estas incluem jejum, uso de medicamentos, postura, exercício físico, ingestão de drogas, tabaco e variação circadiana de determinados analitos. Assim sendo, é dever do laboratório fornecer orientações claras e, preferencialmente, por escrito, relativas ao preparo para a realização dos exames laboratoriais (3,6).

2.2 Colheita

O início da colheita começa com a interpretação da prescrição médica. O técnico que efetua a colheita deve avaliar e confirmar com o doente as condições requeridas para a realização dos exames laboratoriais (jejum requerido, dieta especial, duração das provas, higiene prévia quando necessário). É da sua responsabilidade garantir as condições pré-analíticas e seguir os procedimentos de colheita de acordo com o Manual de Colheitas do Laboratório. Para além disso, é muito importante registar as informações clínicas do utente e outras consideradas relevantes (medicação, gravidez, vacinação) durante a colheita, pois poderão ser importantes na interpretação dos resultados analíticos.

A punção venosa é o procedimento mais comum para obtenção de amostras sanguíneas, que constituem o principal produto biológico para a realização de exames laboratoriais. Dá-se preferência às veias basílica, mediana e cefálica no membro superior, devendo-se evitar locais com cicatrizes de queimaduras, hematomas, fístulas e membro do lado oposto onde foi realizada mastectomia ou com canalização intravenosa (1,3).

A técnica de colheita de sangue venoso pode ser por vácuo (sistema fechado) ou com seringa e agulha (sistema aberto). O sistema por vácuo (Fig.2) é o mais recomendado e utilizado no mundo por possibilitar melhores condições de padronização, conforto e segurança. A qualidade da amostra colhida pelo sistema a vácuo é considerada mais elevada e representativa do que a amostra obtida pelo sistema seringa/agulha. O principal fator é a adequada proporção sangue/anticoagulante. O sistema por vácuo oferece a garantia de aspiração de um volume de sangue proporcional à quantidade de anticoagulante presente no tubo e, conseqüentemente, a redução de causas de erro, como hemodiluição, volumes insuficientes, hemólise e formação de microcoágulos (6).



Fig. 2- Sistema de colheita por vácuo BD Vacutainer

A grande maioria das colheitas efetuadas no LJC são pelo sistema de vácuo. A colheita com seringa/agulha pode ser útil quando se tem de recorrer às veias do dorso da mão, em pessoas idosas com veias mais frágeis e em algumas colheitas pediátricas.

Os tubos para colheita de sangue distinguem-se pela presença ou ausência de anticoagulante específico. A tabela 1 resume os principais tipos de tubo, de anticoagulante, mecanismos de acção, tipo de amostra obtida e uso (3).

Tabela 1- Principais tipos de tubo, anticoagulante, mecanismos de acção, tipo de amostra obtida e uso analítico

Anticoagulante	Mecanismo de acção	Tipo de amostra/ uso
Ausente (Tubo com Gel activador)	-----	Soro/ Bioquímica, Serologia, Imunologia
K₃EDTA	Ação quelante sobre os iões cálcio	<ul style="list-style-type: none"> • Sangue total/ Hematologia • Plasma (após centrifugação) / Endocrinologia, Bioquímica
Citrato de sódio (3.2% 0,105M)	Ação quelante sobre os iões cálcio	Plasma / Estudo da coagulação
Heparina de Lítio	Ação inibidora da trombina	Plasma/ Bioquímica
Fluoreto de sódio/EDTA	<ul style="list-style-type: none"> • Ação quelante sobre os iões cálcio • Inibidor glicolítico 	Plasma/ Doseamento de glicose e lactato

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

Segundo o Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), a recomendação da sequência de tubos a colher em sistema por vácuo é:

1. Tubo de citrato de sódio;
2. Tubo com ativador de coágulo, com ou sem gel para obtenção de soro;
3. Tubo de heparina;
4. Tubo de EDTA;
5. Tubo de fluoreto/EDTA.

É muito importante que esta sequência seja respeitada, para que não ocorra contaminação por anticoagulantes nos tubos subsequentes (contaminação cruzada), quando há necessidade de realizar a colheita para diversas determinações analíticas num mesmo doente (6).

Nos casos em que a colheita é efetuada pela sistema tradicional seringa/agulha, a ordem de distribuição do sangue é diferente, devendo-se primeiro distribuir o sangue pelos tubos com anticoagulante (primeiro para o tubo com citrato e depois para o com EDTA) e no fim para o tubo seco.

Relativamente às outras amostras biológicas (urina, fezes, exsudados, expectoração, entre outras) é muito importante que a sua colheita seja feita de acordo com as normas do Manual de Colheitas do Laboratório, cabendo ao técnico verificar a sua integridade e qualidade, principalmente, quando a colheita é efetuada pelo utente, como acontece com a urina, expectoração, fezes e esperma. Depois de colhidas e identificadas adequadamente, as amostras devem ser encaminhadas o mais rapidamente possível para uma zona de processamento no laboratório para diminuir ao máximo alterações decorrentes do tempo.

2.3 Transporte e armazenamento de produtos biológicos

Quando após a colheita não é possível o transporte rápido das amostras para o laboratório, é muito importante seguir as seguintes recomendações:

- Refrigeração das amostras biológicas a 2-8°C (à exceção das hemoculturas e fezes para coprocultura que devem ser mantidas à temperatura ambiente e o liquor a 35°C);
- Utilização de meios de transporte adequado:
 - meio de Stuart (suporta a viabilidade da maioria das bactérias);
 - meio com carvão (para pesquisa de microrganismos mais sensíveis como a *Neisseria gonorrhoeae*);
 - meio de Cary Blair (transporte de fezes),

para todos os produtos para análise microbiológica, cujo processamento laboratorial não possa ser efetuado dentro do período de tempo adequado (até +- 2 horas);

- A estabilização das amostras deve ser adequada às suas características e da análise a realizar, atendendo ao tempo e distância do transporte.

(7)

Durante o armazenamento, a concentração dos constituintes sanguíneos numa amostra pode mudar como resultado de vários processos. Embora em grau variável, estas alterações ocorrem tanto à temperatura ambiente, como durante a refrigeração ou congelamento das amostras. Assim, as condições de armazenamento variam de acordo com o analito (3).

2.4 Triagem

O departamento da Triagem é onde se procede à receção, verificação dos critérios de rejeição (exemplos na tabela 2) e processamento pré-analítico (centrifugação, aliquotagem, separação imediata do soro ou plasma das células sanguíneas, proteção da luz, medição de volumes, entre outros) das amostras biológicas. Para as amostras que não são logo encaminhadas para as áreas analíticas, deve ser tomado todo o cuidado para que o prazo máximo e as condições ideais de armazenamento sejam respeitados evitando-se interferência nos resultados analíticos.

Tabela 2- Principais critérios para rejeição de amostras

Critérios Gerais
Preparação inadequada do doente; falta de informação sobre a proveniência da amostra e exames pretendidos; amostra mal identificada; recipiente ou meio de transporte inadequado; amostra conspurcada; volume inadequado da amostra; amostra inadequada para o exame solicitado
Sangue
Anticoagulante inapropriado; proporção sangue/anticoagulante inadequada; hemólise acentuada; presença de coágulos ou microcoágulos
Urina
Presença de fezes ou outros elementos estranhos; amostras colhidas em recipiente que não o fornecido pelo laboratório; amostras colhidas fora do laboratório e que não sejam refrigeradas em tempo > 2 h após a micção; volume incorreto na colheita de urina de 24 horas
Fezes
Presença de urina; amostras colhidas em recipientes não fornecidos pelo laboratório; presença de elementos estranhos
Amostras para cultura microbiológica
Amostra colhida de uma região inadequada; amostras enviadas sem meio de transporte adequado; amostra para pesquisa de anaeróbios em recipiente inadequado; amostras não colhidas em recipiente estéril (ex.: urocultura, lavado broncoalveolar, expectoração, espermocultura)

(6)

Na triagem, o procedimento pré-analítico mais utilizado é a centrifugação. A maioria das análises laboratoriais em amostras de sangue, urina ou líquidos cavitários, sejam elas bioquímicas, imunológicas ou de coagulação, requer uma centrifugação prévia para separar o soro ou o plasma das células sanguíneas. O cumprimento de requisitos de qualidade na fase de centrifugação minimiza a repetição de colheitas, por prevenir problemas que possam afetar as amostras biológicas (tais como: centrifugação incompleta, interferência em dosagens hormonais, erros propiciando aumento de índices de hemólise, perdas de amostras) além de reduzir custos e contribuir para maiores níveis de produtividade (6).

As amostras de sangue para a grande maioria dos pedidos de bioquímica, endocrinologia e imunologia devem ser colhidas em tubo seco (de preferência com gel ativador de coagulação) e centrifugadas aproximadamente a uma velocidade de 3500 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos à temperatura ambiente, obtendo-se soro.

Para os testes de coagulação mais solicitados: tempo de protrombina (TP) / Razão Normalizada Internacional (INR), tempo de tromboplastina parcial activado (aPTT), doseamento do fibrinogénio, tempo de trombina, as amostras devem ser colhidas para

tubos contendo citrato de sódio a 3,2% e centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente, obtendo-se plasma citratado.

Existem outras especificações de centrifugação que dependem do analito a dosear, por exemplo: para a determinação da hormona adrenocorticotrofina (ACTH), a centrifugação da amostra deve ser realizada em condições refrigeradas; para a prova de agregação plaquetária a amostra deve ser centrifugada a rpm mais baixa (6).

3- Fase Analítica

3.1- Core Laboratorial

São efectuadas determinações analíticas no âmbito da química clínica, endocrinologia, hematologia, imunohematologia e da serologia de doenças infecciosas; estudo dos diversos sistemas metabólicos e da homeostasia relacionados com o funcionamento fisiológico e fisiopatológico dos diversos órgãos, monitorização terapêutica de fármacos, pesquisa de substâncias psicoactivas e monitorização dos doentes no contexto da doença da adição, assim como da avaliação funcional dos eixos endocrinológicos; estudo dos elementos figurados do sangue, da hemostase, trombofilia e fibrinólise, assim como a determinação dos grupos sanguíneos (sistema AB0, Rh e Kell) e a pesquisa, identificação e titulação de Acs com especificidade para Ags eritrocitários de elevada prevalência (autoAcs e aloAcs clinicamente significativos) (8).

3.1.1- Hematologia

A. Equipamentos, Metodologias e Parâmetros

i. ADVIA 2120

O analisador hematológico ADVIA 2120 (Fig. 3) é o equipamento utilizado para análise quantitativa e qualitativa dos elementos figurados do sangue.

Esta análise, vulgarmente, conhecida como Hemograma é um dos exames laboratoriais mais requisitados ao Laboratório e contempla:

- ✓ Eritrograma (Contagem de eritrócitos (RBC); Hematócrito (Ht); Hemoglobina (Hb); Volume globular médio (VGM); Hemoglobina globular média (HGM); Concentração de hemoglobina globular média (CHGM); Índice de dispersão eritrocitária (RDW);
- ✓ Leucograma (Contagem total de leucócitos (WBC) e fórmula leucocitária;

- ✓ Trombocitograma (Contagem de plaquetas);
- ✓ Estudo morfológico do sangue periférico. Inclui a avaliação de alterações qualitativas e/ou quantitativas das diferentes linhagens celulares sanguíneas (eritrocitária, leucocitária e trombocítica) assim como dos seus precursores eventualmente presentes no sangue periférico.

É uma análise muito importante no estudo de patologias eritrocitárias (principalmente das anemias), de anomalias leucocitárias e distúrbios trombocíticos. Para além disso, é um auxiliar de diagnóstico de várias condições como síndrome febril indeterminado, distúrbios na hemostase primária e na monitorização de terapêuticas conhecidas por afetar as células sanguíneas, como é o caso da quimioterapia ou da radioterapia (9,10).



Fig.3- Analisador hematológico ADVIA 2120

Este analisador tem várias câmaras de contagem com diferentes métodos que se encontram resumidos na tabela 3 (11).

Tabela 3- Métodos de determinações hematológicas utilizados no aparelho 2120

Determinação Hematológica	Método
Eritrócitos	Impedância
Hemoglobina	Cianometahemoglobina
Plaquetas	Impedância
Leucócitos	Citometria de fluxo com citotóxica Perox
Reticulócitos	Corante oxazine 750

Canal de eritrócitos e plaquetas

Eritrócitos

No canal RBC existe um conjunto ótico laser. Os glóbulos vermelhos (GV) ao passarem através de uma fenda iluminada pela luz de um laser vão difundir a luz em ângulos baixos e altos. Através da Teoria de Mie, sobre a dispersão da luz para as esferas homogêneas, a

medição da dispersão da luz em ângulo baixo é convertida em volume celular e a medição da dispersão da luz em ângulo alto é convertida em concentração de Hb (11).

Vários histogramas podem ser obtidos (destaco 2):

- Histograma RBC Volume (fig.4) representa a distribuição dos eritrócitos por volume celular. O histograma apresenta uma gama de valores de 0 fL a 200fL. As amostras normais apresentam uma distribuição entre 60 fL e 120 fL. O VGM é obtido pela média do histograma de volumes e o RDW que corresponde ao coeficiente de variação da distribuição do volume eritrocitário.

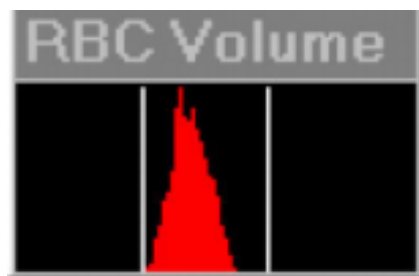


Fig.4 – Distribuição dos eritrócitos por volume celular

- Histograma eritrocitário VGM / Hb globular (fig.5) é uma representação gráfica da distribuição celular dos GV, sendo apresentada no eixo x a concentração hemoglobínica eritrocitária (CHCM) e no eixo y o VGM.

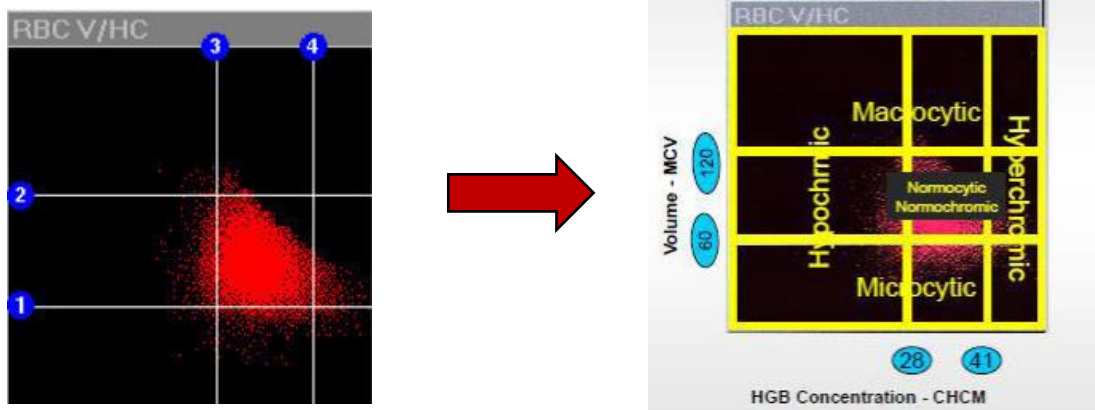


Fig. 5 – Histograma eritrocitário VGM /Hb Globular

Este tipo de histograma é particularmente útil para avaliação do tamanho e cromia dos eritrócitos, sendo que uma população eritrocitária normal se situa no centro do histograma (11).

Plaquetas

Um sinal de dispersão de luz de ângulo baixo (2° a 3°) é ampliado 30 vezes e um sinal de dispersão de luz do ângulo alto (5° a 15°) é ampliado 12 vezes. Estes sinais de “alto-ganho” são utilizados para analisar as plaquetas e originar o histograma de plaquetas (Fig.6). Através da Teoria de Mie sobre a dispersão da luz para as esferas homogêneas a medição da dispersão de luz do ângulo baixo e do alto-ganho é convertida num coeficiente de refração (11).

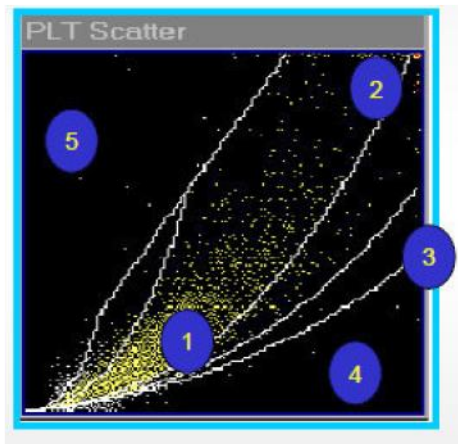


Fig.6 – Histograma da análise de plaquetas

- 1- Plaquetas
- 2- Plaquetas gigantes
- 3- Eritrócitos
- 4- Fragmentos de eritrócitos
- 5- Fantomas de eritrócitos

O trombocitograma é útil no rastreio e diagnóstico de várias patologias e condições que afetam o número de plaquetas, tais como, distúrbios hemorrágicos ou de coagulação excessiva, doenças mieloproliferativas e monitorização da evolução e do tratamento das mesmas, e na monitorização de terapêuticas conhecidas por afetar o número de plaquetas (3,18).

Os analisadores hematológicos fornecem outros dois parâmetros: o volume plaquetário médio (MPV) e o coeficiente de variação da distribuição do tamanho das plaquetas (PDW). O MPV encontra-se aumentado quando existem macrotrombócitos e/ou plaquetas gigantes.

Parâmetros eritrocitários calculados pelo equipamento

➤ Volume Globular Médio (VGM)

O VGM corresponde ao volume médio dos GV e é calculado diretamente pela média do histograma RBC /Volume (fig.4). Expressa-se em fentolitros(fl).

➤ Hematócrito (Ht)

O Ht corresponde ao volume relativo ocupado pelos GV, num dado volume de sangue total. No aparelho ADVIA 2120 é calculado a partir do VGM e do valor total de RBC, com base na fórmula:

$$Ht (L/L) = (VGM \times RBC(x10^{12}/L)) \div 10$$

➤ Hemoglobina Globular Média (HGM)

Indica a quantidade/peso médio de Hb contida nos GV da amostra e expressa-se em picogramas. Calcula-se a partir do valor de Hb e de GV segundo a seguinte fórmula:

$$HGM (pg) = \frac{HGB (g/dL)}{GV (x10^{12}/L)} \times 10$$

➤ Concentração da Hemoglobina Globular Média (CHGM)

Indica a concentração média de hemoglobina nos GV e expressa-se em g/dl. Calcula-se a partir do valor de Hb e Ht segundo a seguinte fórmula:

$$CHGM (g/dL) = \frac{HGB (g/dL)}{Ht (L/L)}$$

➤ Média das concentrações hemoglobínicas dos eritrócitos (CHCM)

Este parâmetro é apenas fornecido nos contadores hematológicos ADVIA. É determinado pela medida direta por *laser scatter* da concentração hemoglobínica dos GV um a um.

➤ Coeficiente de dispersão eritrocitária (RDW)

O RDW é o coeficiente de variação da distribuição do volume eritrocitário. É calculado diretamente nos contadores automáticos a partir do histograma de distribuição do volume dos eritrócitos.

Os índices hematimétricos (VGM,HGM,MCHC e RDW) são muito úteis no diagnóstico diferencial das anemias e na sua orientação etiológica (12).

O VGM permite diferenciar as anemias quanto ao tamanho dos GV: microcíticas (valor abaixo dos valores de referência (VR) <80 fL), normocíticas (valor dentro dos VR, 80 -100 fL) e macrocíticas (valor acima dos VR,> 100 fL) (12).

O CHGM permite diferenciar as anemias quanto ao conteúdo em Hb nos GV: hipocrômicas (valor abaixo dos VR <32 g/dL)ou normocrômicas (valor dentro dos VR, 32-36 g/dL). Quando o seu valor é superior aos VR (>36,0 g/dL) é de suspeitar de esferocitose eritrocitária (12).

O RDW é um parâmetro indicador de anisocitose eritrocitária e pode ser útil no auxílio da diferenciação dos dois tipos mais frequentes de anemia microcítica: anemia ferropénica (habitualmente associada a um aumento do RDW (>17%))e beta-talassemia (habitualmente associado a valores de RDW normais (12-17%) (10).

Canal de reticulócitos

Os reticulócitos são precursores imediatos dos eritrócitos maduros. São já células anucleadas mas, dada a sua imaturidade, conservam ainda restos de RNA no citoplasma (sobretudo RNA ribossomal) que pode ser evidenciado através de uma coloração específica.

A diferenciação para os eritrócitos é conseguida através da utilização de um reagente que permite a esferificação isovolumétrica dos eritrócitos e plaquetas e a coloração das células de acordo com o seu conteúdo em ácido ribonucleico (RNA). As sequências características da dispersão da luz são proporcionais ao tamanho da célula e à concentração de hemoglobina, e a absorção de luz é proporcional ao conteúdo de RNA (11).

O principal interesse da sua determinação é apreciar a atividade eritropoiética da medula para:

- Diagnosticar se uma anemia é regenerativa (hemorragia aguda, anemia hemolítica)) ou arregenerativa (ausência de resposta medular, como acontece na anemia aplástica e neoplasias hematológicas);
- Monitorizar o tratamento de anemias (anemia ferropénica, anemia perniciosa, anemia por deficiência em ácido fólico);
- Verificar se há regeneração sanguínea após uma grande perda globular (hemorragia ou hemólise)

(10,12)

Canal Perox

A fórmula leucocitária é determinada por citometria de fluxo com reação citoquímica da peroxidase. A combinação da dispersão da luz, coloração citoquímica e densidade nuclear permite medir a totalidade e diferenciar os glóbulos brancos (11).

O histograma PEROX (Fig.7) encontra-se dividido em 100 canais de contagem de cada eixo. As células absorvem a luz proporcionalmente à quantidade de coloração da peroxidase presente, sendo representada no eixo X. Os neutrófilos, eosinófilos e os monócitos são peroxidase positiva e os linfócitos e basófilos são peroxidase negativa (11).

As células dispersam a luz proporcionalmente ao seu tamanho, sendo representado no eixo do Y. Quando os dados de dispersão de luz e de absorção são traçados, formam-se populações ou *clusters* distintos (11).

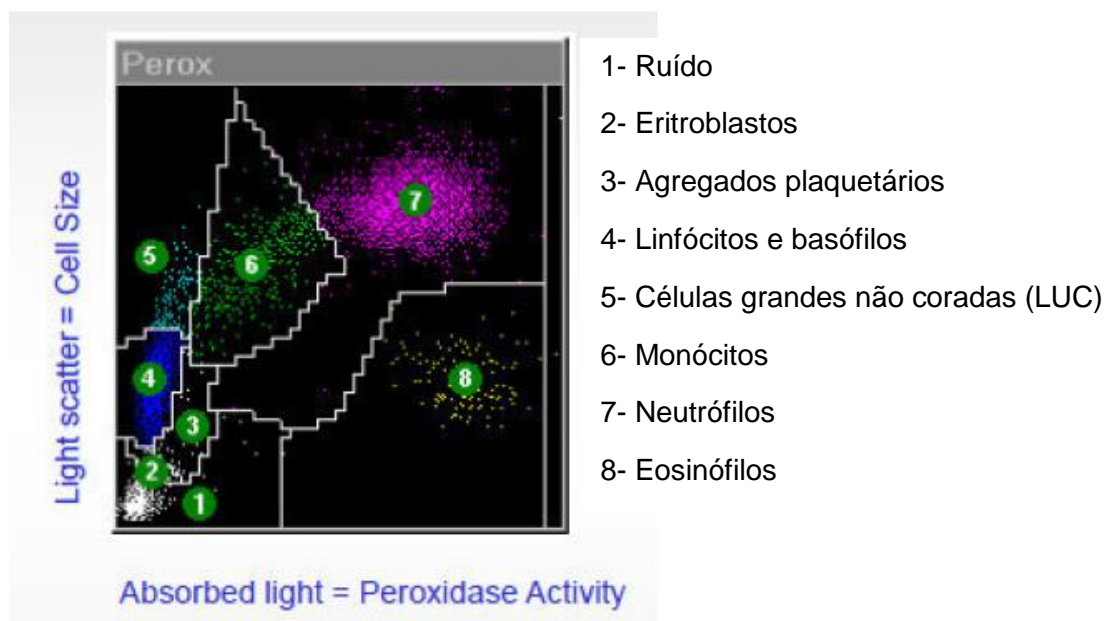


Fig.7- Histograma PEROX

Canal Baso

Os leucócitos são também avaliados pelo canal de basófilos através da adição de um reagente que lisa os eritrócitos e plaquetas e retira o citoplasma a todas as células, excepto aos basófilos permitindo depois a sua diferenciação. Os leucócitos separados podem ser classificados como células mononucleares ou polimorfonucleares com base na forma e complexidade dos seus núcleos celulares. Os basófilos intactos distinguem-se facilmente dos núcleos celulares mais pequenos (11).

No histograma BASO (Fig.8) a dispersão da luz relativa à configuração do núcleo é traçada no eixo x e a dispersão da luz relativa ao tamanho da célula é traçada no eixo y, originando as diferentes populações (11).



Fig.8- Histograma BASO

O leucograma consiste na contagem total e diferencial de leucócitos. A contagem total de leucócitos é útil no despiste e auxílio ao diagnóstico de infecções, processos inflamatórios ou de outras patologias que afetam os leucócitos, e na monitorização da progressão clínica e terapêutica dessas doenças ou condições e/ou da funcionalidade da medula óssea (3,12).

A contagem diferencial dos leucócitos visa classificá-los quanto aos diferentes tipos celulares, estádios de maturação e identificar células anormais/atípicas e inclusões citoplasmáticas. Os leucócitos normalmente presentes no sangue periférico são, habitualmente, classificados em cinco categorias: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos, sendo expressos em percentagem ou como contagem absoluta. Salientar que as citoses e as citopenias só são clinicamente significativas se forem absolutas (9,12).

A contagem diferencial é utilizada no auxílio ao diagnóstico e/ou monitorização de patologia que afetam um ou mais tipos de leucócitos como as infecções, situações inflamatórias, alergias, disfunções imunitárias, leucemias, mielodisplasias e neoplasias mieloproliferativas (3,10).

ii- Advia Autoslide Maker

É um aparelho acoplado ao Advia 2120 (fig.9) utilizado para execução e coloração automática de esfregaços de sangue periférico pelo método de coloração de May-Grunwald-Giemsa. É uma coloração panótica que combina as vantagens de vários corantes, corando elementos basófilos, elementos acidófilos, granulações neutrófilas e granulações azurófilas.



Fig. 9- Advia Autoslide Maker

O fundamento associado à coloração de May-Grunwald-Giemsa está representado na fig.10.

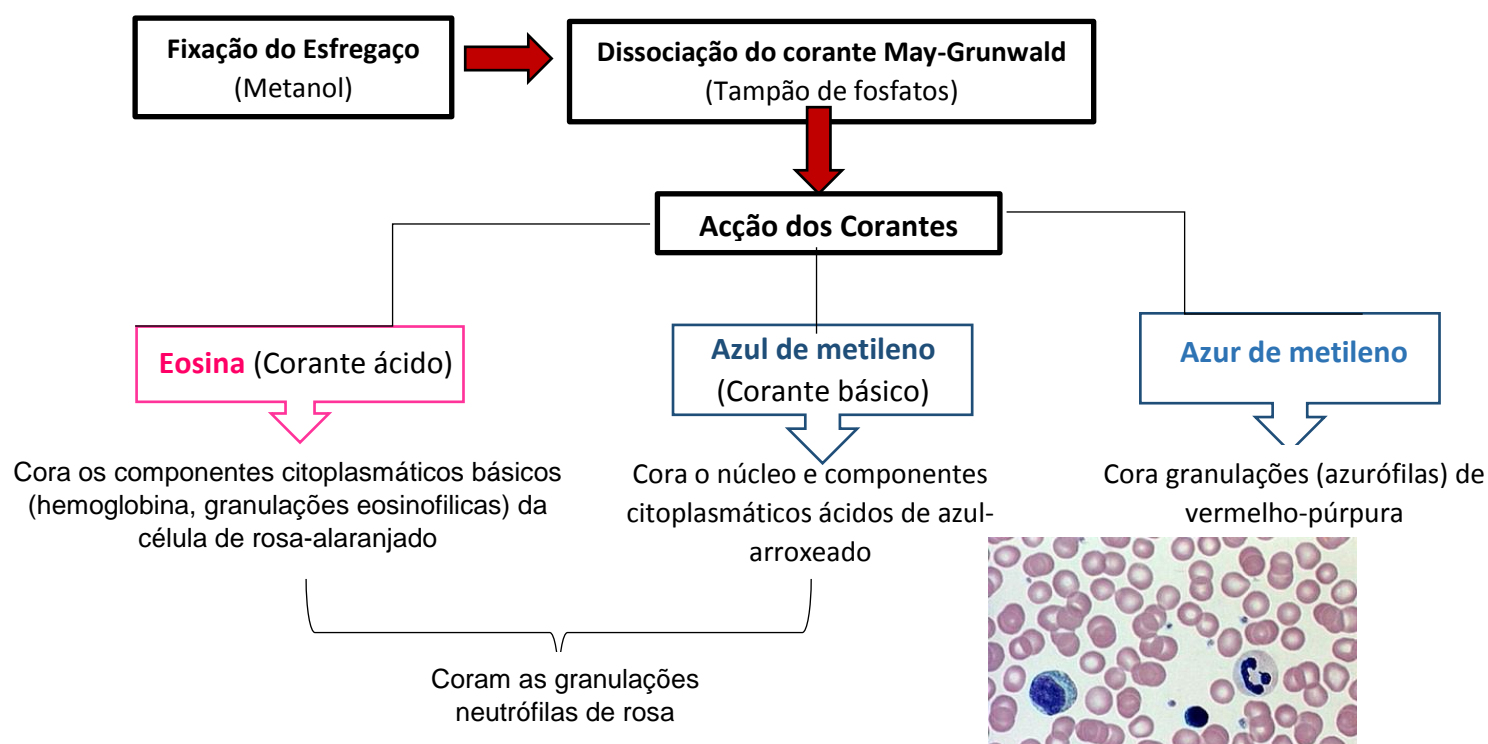


Fig.10 Fundamento da coloração de May-Grunwald-Giemsa

Aspeto do esfregaço após coloração

O estudo morfológico de sangue periférico (EMSP) deve se feito a partir de uma amostra de sangue total (EDTA). Este é o anticoagulante de eleição pois conserva a morfologia dos leucócitos e GV até 2 h após a colheita e assegura a conservação das células a 4°C até 24 h após a colheita. O sucesso da análise morfológica depende de uma boa execução e coloração do esfregaço e da familiaridade com a aparência morfológica dos tipos celulares normais e patológicos (fig.11).

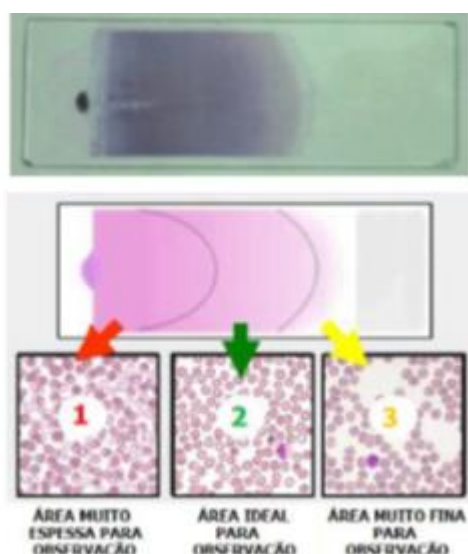


Fig.11 – Esfregaço de sangue periférico corado. Em baixo área ideal para observação de esfregaços ao centro (2) e nas franjas (3)

O EMSP é muito importante na avaliação de patologias do foro hematológico. Embora possa ser sugerido um diagnóstico específico com base em resultados obtidos por métodos automáticos, muitas patologias têm uma contagem celular normal mas com morfologia celular anormal. Existem várias alterações na série eritrocitária (ex. aniso e poiquilocitose), leucocitária (ex. células imaturas e/ou anormais) e trombocítica (ex. presença de agregados e plaquetas gigantes) que só podem ser avaliadas através da observação de um esfregaço sanguíneo (10,12).

O EMSP deve ser efetuado quando seja expectável que o seu resultado possa acrescentar valor semiológico ao hemograma ou possa ter repercussões significativas nas decisões clínicas. Na tabela 4 encontram-se resumidas as principais razões clínica e laboratorialmente para a realização do EMSP (9).

Tabela 4 - Razões para realização do estudo morfológico de sangue periférico

Clínica	Clínica sugestiva de anemia, icterícia inexplicável, drepanocitose, trombocitopenia, neutropenia, doença mielo ou linfoproliferativa, presença de esplenomegália, sintomas sistêmicos e inesperados como febre, sudorese, prurido, emagrecimento e palidez.	
Laboratorial		
	Valores Mínimos de Consenso	Valores Máximos de Consenso
Hb (g/dL)	<7	2g/dL acima dos VR
MCV (fL)	<75	>105
PLT ($\times 10^9/L$)	<100	>1000
WBC ($\times 10^9/L$)	<4	>30
NEU ($\times 10^9/L$)	<1	>20
LYN ($\times 10^9/L$)	---	>7
MONO ($\times 10^9/L$)	---	>1,5
EOS ($\times 10^9/L$)	---	>2,0
BASO ($\times 10^9/L$)	---	>0,05

São considerados com alterações patológicas significativas os EMSP que apresentem:

i. Morfologicamente: alterações dos eritrócitos, das plaquetas, visualização de corpos de Dohle, de granulações tóxicas ou de vacúolos;

3. Tipos celulares: células blásticas, metamielocitos, mielocitos, promielocitos, linfocitos atípicos, eritroblastos e/ou plasmocitos.

(9)

É habitual, em consonância com as *guidelines*, o laboratório de hematologia ter definido os próprios critérios para a realização de EMSF e que tipo de alterações morfológicas significativas devem ser reportadas no relatório dos resultados do doente.

iii- Analisador VES-Matic Cube-200

O VES-Matic Cube-200 (Fig.12) é um analisador automático para determinação da velocidade de sedimentação eritrocitária (VSE) a partir de amostras de sangue total com EDTA tripotássico.

O equipamento faz uma homogenização automática da amostra, ficando a mesma em repouso durante um período de tempo pré-determinado permitindo assim que a sedimentação ocorra. Através de sensores analógicos o aparelho determina o nível de sedimentação dos eritrócitos e calcula automaticamente o valor. As leituras são efectuadas por feixe de luz visível, sendo a primeira feita após a homogenização e outra passados aproximadamente 20 minutos. São realizadas subsequentes leituras até obtenção de um valor constante e estável. Os resultados são obtidos em aproximadamente 20 minutos sendo comparáveis com os resultados obtidos pelo método de referência de *Westergren* de 1 hora (13).



Fig.12-Analisador VES-Matic Cube-200

A VSE é definida pela velocidade de queda espontânea dos GV em suspensão no plasma. É um parâmetro laboratorial não específico porque existem várias situações clínicas que originam o seu aumento, tais como, infeções agudas e crónicas, apendicite, doenças reumatológicas, necrose tecidular, neoplasias em geral, anemias, entre outros, contudo, pode ajudar o médico a diagnosticar e/ou monitorizar o processo de uma patologia inflamatória, bem como a resposta deste tipo de situações à terapêutica. Na interpretação dos resultados é preciso ter em conta as variações fisiológicas que originam o aumento da VSE, nomeadamente, idade, sexo feminino, menstruação e gravidez, bem como as que originam a sua diminuição, como as alterações na forma (esferocitose) e quantidade dos eritrócitos (poliglobulias) (14).

É preciso também ter em conta os possíveis interferentes analíticos, sendo que a concentração excessiva de anticoagulante e a presença de rouleaux podem originar um falso aumento da VSE, por outro lado, o aumento do fibrinogénio, viscosidade ou processamento da amostra 2 horas (à temperatura ambiente) após a colheita pode originar falsos resultados baixos (10,12).

Por vezes recorre-se ao Método de Westergren modificado (Fig.13) para confirmação de resultados de VSE muito elevados obtidos com o VES-Matic Cube-200, ou quando a quantidade de amostra não é suficiente para efetuar a determinação no equipamento automático. Nesta situação, coloca-se 1 ml da amostra de sangue com anticoagulante (EDTA tripotássico) e depois diluído em citrato de sódio na proporção de 4 volumes de sangue para 1 volume de anticoagulante no tubo para encaixe da pipeta. Introduzir a pipeta de Westergren, graduada de 0 a 150 mm, no suporte adequado e em posição vertical. Iniciar a contagem no cronómetro e deixar 1 hora à temperatura ambiente. Ao fim de 1 hora fazer a leitura em milímetros, ao nível da coluna dos glóbulos que se separam do plasma.

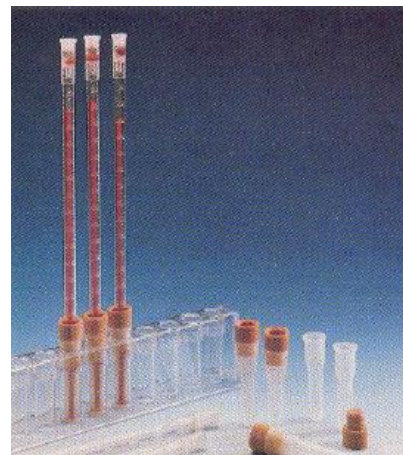


Fig.13- Método de Westergren modificado

iv- **Analizador BCS XP System**

O BCS XP System (Fig.14) é um analisador automático com capacidade de execução de ensaios de formação de coágulo (com medições fotométricas aos 405 ou 570 nm), cromogénicos (com medições fotométricas aos 340, 405 ou 570 nm), imunológicos (com medições turbidimétricas aos 405 ou 570 nm) e de aglutinação numa mesma plataforma (15).



Fig.14- Analizador BCS XP System

Destina-se à execução de vários testes para avaliação da hemostase e da coagulação, nomeadamente: determinação de TP, aPTT, Tempo de Trombina, Doseamento de factores de coagulação, antitrombina C, Fibrinogénio, D-Dímeros, Proteína C e S, entre outros.

Os testes mais prescritos em ambulatório para estudo da coagulação são o TP e aPTT. Os princípios inerentes a estes testes são:

- TP- consiste num teste funcional de medição do tempo que leva a coagular uma amostra de plasma anticoagulado com citrato. A adição de tromboplastina tecidular desencadeia a formação do coágulo de fibrina por activação da via extrínseca da coagulação, na presença de cálcio;

- aPTT- consiste na incubação da amostra de plasma citratado, com uma quantidade otimizada de fosfolípidos (Cefalina), um ativador de contacto com carga negativa (Tromboplastina) e tampão. Após a incubação a 37 °C o cloreto de cálcio que se adiciona desencadeia o processo de activação da via intrínseca da coagulação e mede-se o tempo necessário para a formação do coágulo.

O padrão de anormalidades obtido utilizando o TP e aPTT fornece, geralmente, uma indicação razoável sobre um possível distúrbio na hemostase e permite orientar para os testes adicionais (tempo de trombina, doseamento de factores da coagulação, d-dímeros, fibrinogénio) necessários para definir esse distúrbio (12).

A medição do TP constitui um teste de triagem rápido e sensível que permite avaliar perturbações da coagulação que podem envolver as vias extrínseca (fator VII) e comum (factores II , V, X e fibrinogénio). É adequado para regulação e monitorização da terapia com anticoagulantes orais como, por exemplo, os cumarínicos análogos da Vitamina K (Warfarina e Sintrom); deteção das deficiências nos factores de coagulação da via extrínseca, triagem pré-operatória e controlo da função hepática (12,14).

O aPTT permite avaliar a atividade das vias de coagulação intrínseca e comum, constituindo o melhor teste de triagem para o diagnóstico de distúrbios da coagulação que não envolvem o fator VII. O aPTT é utilizado na triagem da hemofilia A e B e outras coagulopatias, na deteção de inibidores da coagulação, na monitorização da terapia com heparina não fracionada e na triagem pré-operatória (3,14).

v- Variant II - Biorad

O Variant II (Fig.15) é um equipamento automático de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), usado para a determinação de Hemoglobina A1C e de outras hemoglobinas variantes (HbF, HbS e HbC). Os resultados são analisados em função dos cromatogramas obtidos (Fig.16).



Fig.15- Aparelho Variant II

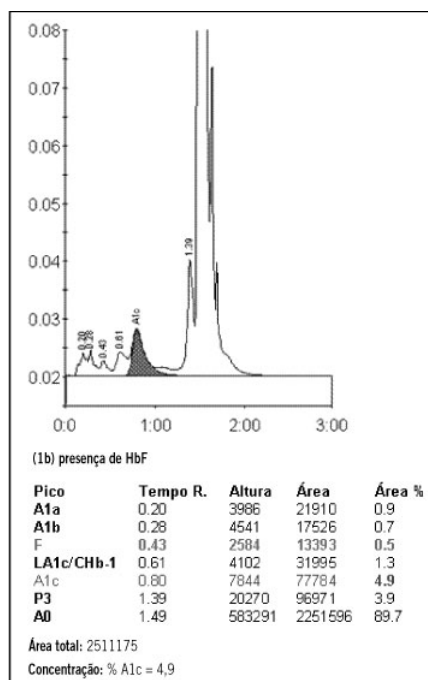


Fig.16-Cromatograma de hemoglobinas

vi- Capillarys 2 Flex Percing Sebia

Este equipamento (Fig.17) permite quantificar as variantes da hemoglobina através de eletroforese capilar de zona (ECZ). Este tipo de método baseia-se na diferença de mobilidade que as moléculas proteicas têm de acordo com as suas cargas elétricas próprias, assim como com a sua massa, forma e hidrofobicidade. A separação das hemoglobinas ocorre num meio líquido tamponado a pH alcalino, no interior de tubos capilares de sílica termostatizados. A velocidade da eletroendosmose leva a uma migração catódica das moléculas que, são detetadas e semiquantificadas (%) diretamente por espectrofotometria a 415 nm, originado um padrão eletroforético (Fig.18) (16).

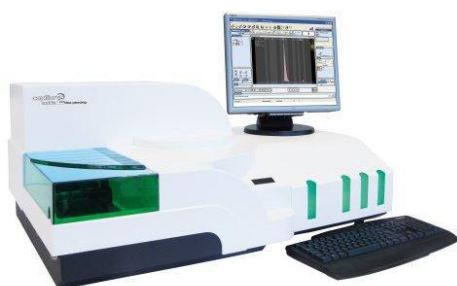


Fig.17- Capillarys 2 Flex Percing Sebia

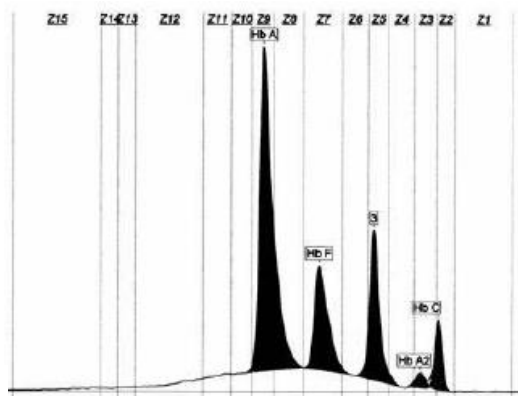


Fig.18- Padrão electroforético ECZ de uma amostra de sangue controlo

A análise de variantes da hemoglobina é utilizada como auxiliar de diagnóstico de hemoglobinopatias. Este tipo de patologias resulta de mutações que ocorrem nos genes responsáveis pela síntese de cadeias de globina da hemoglobina e podem ser quantitativas (α e β Talassémias) ou qualitativas (drepanocitose e outras variantes de hemoglobina (Hb C, HbD, Hb Lepore) (10,12).

As formas graves mais comuns em Portugal - drepanocitose, β -Talassémia Major e Intermédia - têm uma transmissão autossómica recessiva. Os portadores de uma mutação (heterozigotos) não são doentes, no entanto, quando casam entre si, têm uma probabilidade de 25%, em cada gravidez, de originar filhos com as duas mutações (homozigotos), que são doentes com um quadro clínico grave, geralmente com elevada morbilidade e mortalidade. Nesse contexto, são consensualmente recomendadas a deteção e informação precoce, preferencialmente pré-concepcional, de adultos portadores (heterozigotos), a identificação e o aconselhamento genético dos casais em risco, e, quando necessário, a oferta de diagnóstico pré-natal (17).

Referir que o estudo de hemoglobinas no LJC é efectuado através destes 2 métodos complementares: a ECZ e a HPLC. A metodologia por HPLC permite a quantificação da HbA, HbA2 e HbF, e a identificação presuntiva das hemoglobinas S, C e D. No entanto, pode apresentar algumas interferências e problemas de resolução, nomeadamente a co-eluição de algumas variantes de hemoglobina com a HbA2. A utilização da ECZ como método complementar permite contornar algumas destas interferências e esclarecer cromatogramas duvidosos.

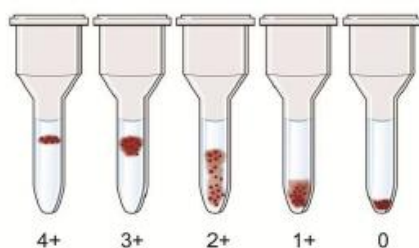
vii- Analisador ORTHO AutoVue Innova System

Este aparelho (Fig.19) destina-se à realização automatizada de testes de imunohematologia, nomeadamente, Tipagem AB0 e Rh, pesquisa de Acs anti-eritrocitários irregulares (PAI), prova de compatibilidade, teste de coombs directo e indirecto.



Fig.19- Aparelho ORTHO AutoVue Innova

Usa a Tecnologia de Aglutinação em Coluna (CAT) (Fig.20), que consiste no uso de cards com reagente e/ou diluente e microesferas de vidro. Após a adição dos eritrócitos à microcoluna, os eritrócitos transferidos são submetidos a centrifugação, sendo forçados a passar através da coluna com microesferas de vidro. Quando ocorre reação de aglutinação os eritrócitos são retidos nas microesferas (resultado positivo), os não aglutinados são depositados no fundo da coluna (18).



*Critério de positividade:
0 corresponde a resultado negativo e 4 corresponde a resultado positivo.*

Fig.20- Tecnologia CAT

Na tabela 5 serão apresentados os fundamentos e principal utilidade das determinações realizadas neste aparelho (18).

Tabela 5 - Fundamentos e utilidade das determinações analíticas no aparelho ORTHO AutoVue Innov

Determinação Imunohematológica	Fundamentos e utilidade associados
Grupo Sanguíneo	<p><u>Tipagem do Sistema AB0</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Prova Globular- Pesquisa de Ags A e B do Sistema AB0 na superfície dos GV. Baseia-se na reação de aglutinação dos GV do doente com anti-soros Anti-A, anti-B e anti- AB. • Prova Reversa- Pesquisa da presença ou ausência de Acs anti-A e/ou anti-B no soro ou plasma do indivíduo. Baseia-se na reação de aglutinação do soro do doente com células eritrocitárias comerciais (GV A1 e B).
	<p><u>Tipagem do Sistema Rhesus (Rh)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Pesquisa de Ag D na superfície dos GV <p>Baseia-se na reação de aglutinação dos GV do doente com um soro anti-D. A sensibilidade do reagente permite detetar a maioria dos D fraco.</p>
Teste da antiglobulina humana- Teste de Coombs	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Directo</u>- Permite detectar GV sensibilizados <i>in vivo</i> por Acs e/ou frações do complemento. Utilizado na investigação de doença hemolítica do recém-nascido, anemia hemolítica autoimune, anemia hemolítica induzida por drogas e reações hemolíticas transfusionais (19). Baseia-se na reação dos GV do doente com antiglobulina humana IgG e o anti C3d poliespecifico. O uso do anti- complemento nos reagentes prende-se com o facto da maioria dos Acs IgM e alguns IgG fixarem o complemento. • <u>Indireto</u>- Permite detetar eritrócitos sensibilizados <i>in vitro</i> por Acs. Os GV do doente são primeiro incubados com o seu soro e de seguida verifica-se se há reação com a antiglobulina humana IgG e o anti-C3d poliespecifico. Este teste deve ser sempre realizado em todas as grávidas Rh negativo (19).

<p>Pesquisa de Ac anti-eritrocitários irregulares (PAI)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Permite detetar Acs anti-eritrocitários irregulares (não AB0) no soro. Baseia-se na reação de aglutinação do soro (amostra preferencial) do doente com três suspensões eritrocitárias de dadores selecionados do grupo 0 com os seguintes Ags: D, C, c, E, e, K, k, jka, jkb, Fya, Fyb, M, N, S, s e Lea. Quando o resultado é positivo deve-se usar um painel de células maior para identificar o Ac específico. <p>Este teste deve ser também realizado em grávidas Rh negativo, em mulheres que dão à luz uma criança com doença hemolítica e em todos os indivíduos que tenham uma reação hemolítica pós transfusional (19).</p> <p>Nota: A amostra preferencial para esta técnica é o soro, porque o plasma com EDTA inactiva o sistema complemento que pode ser importante no aumento da sensibilidade na detecção de determinados Acs com significância clínica (exemplo: Anti- Kidd)</p> <ul style="list-style-type: none"> • É usada em provas de compatibilidade para detetar Acs irregulares, clinicamente significantes no soro do doente, que possam reagir com os RBC do dador.
--	---

GV- glóbulos vermelhos ; Acs-anticorpos

B. Técnicas Manuais

Na área da hematologia são também realizadas algumas técnicas manuais mais específicas como, por exemplo, a prova de falciformação, a prova da fragilidade osmótica ou a coloração de Perls. Destacarei a prova da falciformação.

A prova da falciformação é um teste de rastreio usado para identificar a presença da Hemoglobina S(HbS). Esta variante de hemoglobina em condições de baixa tensão de oxigénio sofre um processo de polimerização originando GV em forma de foice e anemias hemolíticas (20).

Neste teste é usado um agente redutor o metabissulfito de sódio que ao reduzir a tensão de oxigénio promove a falciformação dos GV quando contem HbS. O maior valor semiológico do teste está na detecção da presença da HbS. A falciformação desenvolve-se nos indivíduos homozigóticos (HbSS), heterozigóticos (HbAS) ou com dupla heterozigotia (HbSC, Hb SE, HbSLepore e HbS / Beta talassémia. É um teste apenas de rastreio sendo o HPLC o método de confirmação (20).

C. Casos Laboratoriais

Serão apresentados alguns casos do foro hematológico e hemostase que aparecem com mais frequência na rotina laboratorial.

Caso 1

Informação Clínica: Senhora de 35 anos, com sinais de cansaço à cerca de 1 mês, pálida e que referiu ter menstruações abundantes.

Dados Laboratoriais

HEMATOLOGIA

	Resultados	Unidades	V.R.
Eritrócitos	4,07	X10 ⁶ /mL	3,80- 4,80
Hemoglobina	10,7	g/dL	12 -15
Hematócrito	31,6	%	36,0 - 46,0
V.G.M.	77,6	fL	80,0 - 97,0
H.G.M.	26,3	pg	27,0 - 32,0
C.M.H.G	33,9	g/dL	32,0 – 36,0
RDW	16,1	%	11,6- 14,0

BIOQUÍMICA

	Resultados	Unidades	V.R.
Siderémia	18	ug/dL	50- 170
Ferritina	5,1	ng/mL	10,0- 291,0
C.T.F.F.	530	ug/dL	291 - 430

C.T.F.F.- Capacidade total de fixação do ferro

Este é um caso típico de anemia ferropénica.

A anemia por deficiência de ferro, constitui a deficiência mais prevalente no mundo. Segundo a OMS, existe anemia se: hemoglobina <13g/dl no homem e <12g/dl na mulher.

A anemia ferropénica, em termos laboratoriais, caracteriza-se por:

✓ O hemograma:

- Microcitose (VGM<80fl) com hipocromia (HGM<27pg), na ausência de deficiência de Vitamina B12 ou de folatos. Atenção que a microcitose e hipocromia também estão presentes nas hemoglobinopatias, anemias sideroblásticas e algumas anemias de doença crónica.
- Por vezes há trombocitose reacional;

- RDW >15% que traduz o grau de anisocitose eritrocitária. O seu aumento ocorre muito precocemente no processo de instalação de défice de ferro. Para além disso pode ter utilidade no diagnóstico diferencial com outras situações que cursam com microcitose e hipocromia nomeadamente as síndromes talassémicas em que está normal, assim como na anemia de doença crónica ou estado inflamatório;
- Diminuição da contagem de Reticulócitos e do seu conteúdo em hemoglobina (CHR)
 - Os índices reticulocitários fornecem informação extremamente sensível e precoce sobre uma eritropoiese deficitária em ferro. Trata-se da população eritrocitária mais recente e, como tal, mais precocemente modificada tanto em situações de instalação de carência de ferro como de resposta à sua reposição terapêutica. Contagem normal na ferropénia, aumenta como resposta eficaz à terapêutica com ferro intra venoso.

✓ Os marcadores bioquímicos:

- Ferro- pode estar diminuído, no entanto a coexistência de processos infecciosos/inflamatórios, mesmo que de carácter menor, interfere com o doseamento, assim como o período do dia em que é feita a colheita. A variabilidade biológica deste parâmetro condiciona, de forma significativa, a sua utilidade diagnóstica;
- Ferritina- É o melhor parâmetro para avaliar os depósitos de ferro do organismo, sendo que baixas concentrações são indicadores de depleção. Como a ferritina é também uma proteína de fase aguda o seu resultado deve ser interpretado com cautela em doentes portadores de patologias inflamatórias e infecciosas. O doseamento da PCR auxilia. Uma ferritina normal, perante uma PCR aumentada não é indicadora do estado de reservas do ferro. Considera-se défice absoluto se ferritina $\leq 15-20$ ng/ml, com Hb ≤ 12 g/dl.
- Transferrina / capacidade total de fixação do ferro/ saturação da transferrina - A transferrina (proteína transportadora de ferro) e a Capacidade Total de Fixação do Ferro (CTFF) são, habitualmente determinados em pessoas com suspeita de anemia ferropénica. O seu aumento indica normalmente deficiência em ferro, no entanto, podem estar elevados em outras situações como gravidez e uso de contraceptivos orais. A Saturação da Transferrina é calculada pela razão entre o ferro sérico e a CTFF e é um indicador mais útil. Se a ST <20% considera-se sinal de ferropénia.

- Receptor solúvel da transferrina (RST)- Embora seja um parâmetro muito pouco prescrito pelos clínicos, é um indicador de déficit de ferro com a grande vantagem de não ser influenciado por processos inflamatórios, o que o torna particularmente útil no diagnóstico diferencial de uma anemia ferropénica (21)

Caso 2

Informação Clínica: Senhor de 65 anos, que se dirigiu ao laboratório para análises de rotina e refere que costuma ter os leucócitos aumentados.

Dados Laboratoriais

HEMATOLOGIA

	Resultados	Unidades	V.R.
Eritrócitos	4,60	$\times 10^6/\text{ul}$	3,80- 4,80
Hemoglobina	14,1	g/dL	12 -15
Hematócrito	40,8	%	36,0 - 46,0
V.G.M.	88,7	fL	80,0 - 97,0
H.G.M.	30,7	pg	27,0 - 32,0
C.M.H.G	34,6	g/dL	32,0 – 36,0
RDW	13,9	%	11,6- 14,0
WBC	18,4	$\times 10^3/\text{ul}$	4,0-10,0
Neutrófilos	11,8	%	40,0-80,0
	2,02	#	1,8-7,5
Eosinófilos	0,5	%	1,0-6,0
	0,09	#	0,04-0,6
Basófilos	0,1	%	0 – 2,0
	0,018	#	0,0-0,2
Linfócitos	84,6	%	20,0-40,0
	15,57	#	1,5-4,0
Monócitos	3,0	%	2,0-10,0
	0,6	#	0,2-1,0
Plaquetas	193	$\times 10^3/\text{ul}$	130-400

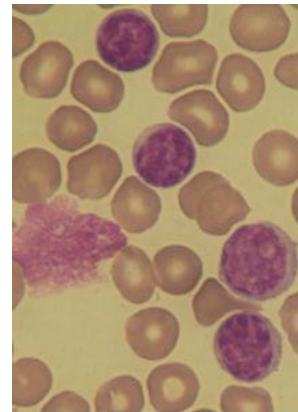


Imagem de observação de esfregaço de sangue periférico ao microscópio.

Face à leucocitose com linfocitose foi feito um EMSP que revelou presença de pequenos linfócitos com morfologia normal e algumas sombras nucleares. Foi sugerida imunofenotipagem do sangue periférico para caracterização das populações leucocitárias.

A presença de linfocitose duradoura sem causa aparente, associada aos dados laboratoriais, faz-nos suspeitar de uma leucemia linfocítica crónica (LLC) que é a neoplasia hematológica mais comum do ocidente e que afecta mais os homens com uma média de idade de 65 anos. Os linfócitos da LLC apresentam um imunofenotipo característico devendo o seu diagnóstico ser confirmado com uma imunofenotipagem, Caso o diagnóstico não seja estabelecido por citometria de fluxo poderá ter de se fazer uma biópsia de um dos gânglios linfáticos (12).

Caso 3

Informação Clínica: Senhora de 60 anos que faz anticoagulante oral Varfarina e se dirige ao laboratório para controlo de INR.

Dados Laboratoriais

COAGULAÇÃO

	Resultados	Unidades	V.R.
Tempo de protrombina	29,0	segundos	10,30- 12,80
Percentagem	25,80	%	82,0- 121,0
INR	2,65		Intervalo terapêutico 2,0 – 3,5

Este é um caso típico de um doente hipocoagulado controlado.

A anticoagulação oral é utilizada numa variedade de situações clínicas com o objetivo de diminuir a coagulação sanguínea. O objectivo é reduzir a possibilidade da formação de coágulos na circulação sanguínea e evitar trombozes e embolias (12).

Atualmente existem diferentes grupos de anticoagulantes orais: os antagonistas da vitamina K, como o *Varfine* (Varfarina) e o *Sintrom* (Acenocumarol), e os novos anticoagulantes orais (Dabigatrano, Rivaroxabano, Apixabano e Edoxabano). No grupo dos antagonistas da vitamina K é necessário uma análise laboratorial periódica, cuidados alimentares e precaução com interações medicamentosas. Relativamente aos novos anticoagulantes orais não há necessidade de qualquer controlo laboratorial.

Uma anticoagulação eficaz pressupõe a manutenção dos níveis de coagulação entre um nível mínimo e um máximo. Se a coagulação se encontrar abaixo dos níveis mínimos continua a existir risco de trombose – aquilo que, afinal, se pretende evitar; se estiver acima dos níveis máximos existe o risco de hemorragias espontâneas ou como resultado de pequenos traumatismos, o que pode ser igualmente sério. A análise que permite esse controle denomina-se tempo de protrombina e é apresentada através de uma medida standardizada conhecida por INR que permite em qualquer laboratório monitorizar a anticoagulação oral (22). Relativamente aos resultados é expectável:

- INR próximo de 1,0: em pessoas saudáveis sem tratamento com anticoagulante;
- INR entre 2 e 3: prevenção e tratamento de trombooses venosas, embolias pulmonares e sistêmicas;
- INR entre 3 e 4,5: Próteses valvulares mecânicas e embolias sistêmicas recidivantes;
- INR > 5,00: Risco hemorrágico é importante

(3) (12)

Caso 4

Informação Clínica: Senhora de 30 anos que se dirige ao laboratório para realizar análises de rotina.

Dados Laboratoriais

HEMATOLOGIA

	Resultados	Unidades	V.R.
Eritrócitos	4,64	$\times 10^6/\text{ul}$	3,80- 4,80
Hemoglobina	14,3	g/dL	12,0 -15,0
Hematócrito	40,7	%	36,0 - 46,0
V.G.M.	87,7	fL	80,0 - 97,0
H.G.M.	30,8	pg	27,0 - 32,0
C.M.H.G	35,1	g/dL	32,0 – 36,0
RDW	12,4	%	11,6- 14,0
WBC	8,12	$\times 10^3/\text{ul}$	4,0-10,0
Neutrófilos	56,4	%	40,0-80,0
Eosinófilos	1,8	%	1,0-6,0
Basófilos	0,4	%	0 – 2,0
Linfócitos	30,2	%	20,0-40,0
Monócitos	11,2	%	2,0-10,0
Plaquetas	90	$\times 10^3/\text{ul}$	130-400

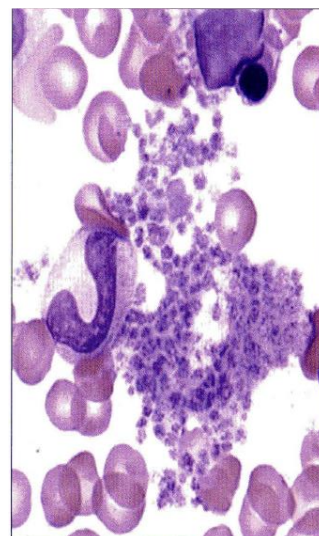


Imagem de observação de esfregaço de sangue periférico ao microscópio.

Quando existe uma contagem de plaquetas significativamente baixa é necessário realizar um EMSP para confirmar a eventual trombocitopenia. Neste caso observou-se a presença de muitos agregados plaquetários o que indica uma pseudotrombocitopenia.

A pseudotrombocitopenia consiste na contagem baixa de plaquetas em amostras colhidas com o anticoagulante EDTA. Essa diminuição é provocada por autoAcs presentes no plasma, que na presença de EDTA ligam-se às plaquetas promovendo a sua aglutinação, formando agregados. Nestes casos recomenda-se uma nova contagem das plaquetas, imediatamente, após a colheita ou em tubo com citrato de sódio. Neste último, o resultado deve ser multiplicado pelo factor de correcção 1,11 correspondente à diluição do sangue no anticoagulante (9+1/9). Este tipo de procedimento, habitualmente, permite normalizar o valor da contagem de plaquetas (22).

3.1.2- Bioquímica Clínica

A- Equipamentos, Metodologias e Parâmetros

i- ADVIA 2400

O ADVIA 2400 (Fig.21) é um autoanalisador de bioquímica clínica que permite a determinação de vários parâmetros bioquímicos (Glucose, Cálcio, Magnésio, Fósforo inorgânico, Colesterol Total (CT), Colesterol HDL (high-density lipoprotein), Colesterol LDL (low-density lipoprotein), Triglicéridos(TG), Ácido úrico, Creatinina, Ureia, ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), GGT (gama glutamil transpeptidase), Fosfatase alcalina (ALP), Amilase, Microalbuminúria, Ferro, Transferrina, Bilirrubina direta, Bilirrubina total, entre outros) em diferentes tipos de amostras biológicas(soro, plasma, urina LCR, derrames das serosas (líquido ascítico, pleural, pericárdico, entre outros)) por ensaios espectrofotométricos, imunoturbidimetria/nefelometria e de potenciometria indireta (23).

O sistema analítico permite também a determinação dos índices de hemólise, icterícia e lipémia das amostras analisadas. Estes índices são úteis na validação analítica dos ensaios, uma vez, que existem várias determinações que sofrem a interferência da hemólise, icterícia ou lipémia em vários graus.



Fig. 21- ADVIA 2400 Chemistry System

Espectrofotometria

A espectrofotometria é o método óptico mais utilizado nas determinações analíticas bioquímicas devido à sua sensibilidade, especificidade, rapidez de resultado e facilidade de automatização. Mede a capacidade de uma substância ou produto derivado de uma reação bioquímica em absorver ou emitir luz, num determinado comprimento de onda, sob condições físico-químicas estabelecidas. A concentração do analito é obtida de acordo com a lei de Lambert-Beer em que a concentração é diretamente proporcional à quantidade de luz absorvida ou inversamente proporcional ao logarítmo da luz transmitida, em relação à luz incidente (2,3,5).

Imunoturbidimetria

A imunoturbidimetria é um ensaio de imunoprecipitação que envolve a formação de imunocomplexos insolúveis em solução que ao receberem uma luz incidente podem provocar dispersão, absorção, reflexão e alteração da transmissão da luz. Esses fenómenos são proporcionais ao tamanho, forma e concentração das partículas e quanto maior a precipitação entre Ag e Ac, maior a dispersão e a reflexão da luz incidente e menor a sua transmitância (3).

É o método mais utilizado para a determinação imunoquímica de proteínas específicas imunoglobulinas(Ig's), componentes do complemento, fator reumatóide e proteína C reativa(PCR) em amostras biológicas (5).

As suas principais vantagens são a precisão, rapidez, facilidade de automatização e ótima sensibilidade devido ao emprego de intensificadores de sinal que podem ser:

- micropartículas inertes de latéx (esferas de poliestireno), recobertas com Ag ou Ac, que amplificam a precipitação e a dispersão de luz. São empregues nas determinações do factor reumatóide, título de estreptolisina e PCR (23).

- polietilenoglicol (PEG) que é uma macromolécula não iónica com a capacidade de remover a água do microambiente formado pelo imunocomplexo e o PEG. Essa remoção vai aumentar e intensificar a força da ligação Ag-Ac com implicação directa no aumento da imunoagregação. É empregue nas determinações das Ig's e factores do complemento C3 e C4 (23).

Potenciometria

Os métodos potenciométricos medem a diferença de potencial entre dois elétrodos numa célula eletroquímica de modo a que o potencial de um dos componentes do par eletrolítico possa ser tomado como uma resposta às concentrações de espécies iónicas presentes na solução. Utilizam-se dois elétrodos, um indicador (seletivo para o ião a ser analisado) cujo

potencial estamos interessados e que reflete a concentração na amostra e um de referência cuja função é manter um potencial reprodutível e constante. As medições realizadas com elétrodos seletivos de íões são simples, geralmente rápidas, não destrutivas e aplicáveis a uma grande variedade de concentrações (5).

O ADVIA 2400 possui um módulo para quantificação de eletrólitos (sódio, potássio, cloretos e lítio) em fluídos biológicos (soro, plasma, sangue total, urina, LCR) através da medição da tensão por elétrodos seletivos de íões (ISE). Na análise de eletrólitos é utilizado um tampão como reagente, cuja tensão é medida, seguida pela medição da tensão da amostra. A diferença entre estas duas tensões determina a concentração do eletrólito na amostra (23).

ii- Autoanalisador de urinas Clinitek Atlas

É um equipamento (Fig.22) utilizado para efetuar o exame físico (pH e densidade) e bioquímico (determinação qualitativa ou semi-quantitativa das proteínas, glicose, corpos cetônicos, pigmentos biliares, hemoglobina, urobilinogénio, nitritos e esterase leucocitária) em amostras de urina.

Utiliza tiras-reagente em que cada tira contém nove zonas reativas independentes, impregnadas de substâncias químicas para a análise de substâncias presentes na urina pela mudança da cor do reativo. O equipamento analisa por espectrofotometria de refletância, a comprimentos definidos, a cor e intensidade da luz refletida por uma zona reativa após a reação. Adicionalmente, cada tira tem uma zona não reativa utilizada para a determinação da cor da amostra. A densidade da amostra é medida utilizando o método do índice de refração e a turvação pela medição da transmissão e dispersão da luz (24).



Fig.22- CLINITEK Atlas Automated Urine Chemistry Analyzer

iii- **Sysmex UF-1000i**

O analisador UF-1000i (Fig.23) utiliza a tecnologia de citometria de fluxo fluorescente combinada com a impedância para a determinação quantitativa dos elementos figurados presentes em amostras de urina e outras amostras biológicas (ex. derrames de serosas). Permite também a quantificação de bactérias presente na urina através de um canal próprio. Durante a análise do sedimento pelo analisador podem surgir sinais de alerta, que indicam a presença na amostra de cilindros patológicos, cristais, células renais, espermatozoides, leveduras e muco. Nestes casos, a análise de sedimento urinário deve ser feita ao microscópio óptico (25).



Fig. 23- Sysmex UF-1000i

iv- **Capillarys 2- Sebia**

O Capillarys 2 (Fig.24) é um equipamento utilizado para a realização da eletroforese das proteínas que é uma técnica usada para separação, quantificação e identificação de proteínas em diferentes amostras biológicas (soro, urina, LCR).



Fig.24- Capillarys 2 Sebia

Este aparelho utiliza o princípio da ECZ que é um método semelhante ao HPLC e que consiste na separação eletrocinética das proteínas em capilar preenchido com tampão alcalino. A combinação do pequeno diâmetro interno do capilar ($<100\mu\text{m}$), alta voltagem e controlo de temperatura apertado permite uma separação rápida e de alta eficiência das proteínas, excelente resolução e reprodutibilidade. A amostra é diluída e aplicada no ânodo do capilar. A separação é efetuada aplicando alta voltagem aos bornes de cada capilar. As moléculas carregadas são separadas pela sua mobilidade eletroforética, num tampão alcalino. O fluxo electro-osmótico exerce uma força superior comparativamente ao campo elétrico gerado, o que faz com que todas as proteínas migrem até ao fim do capilar em direção ao cátodo. As frações proteicas separadas são detetadas e semiquantificadas percentualmente por espectrofotometria ao nível da extremidade catiónica dos capilares e elaborados os respetivos perfis electroforéticos (Fig.25) (26).

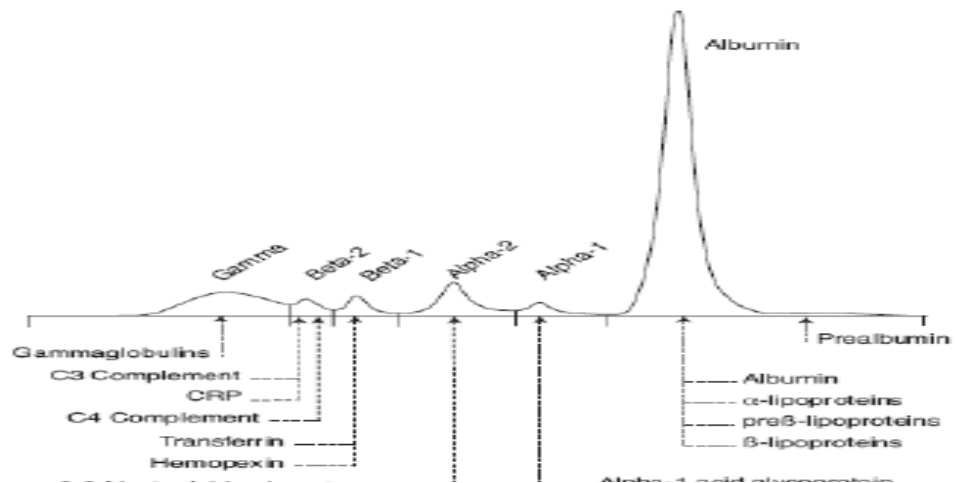


Fig.25- Perfil electroforético- Localização das proteínas separadas

A principal vantagem da ECZ em relação à eletroforese em gel reside na dissipação de calor mais eficiente, permitindo a aplicação de gamas de tensão elétrica maiores, o que melhora a eficiência na separação das bandas electroforéticas e reduz o tempo da separação. Devido à sua alta resolução, a eletroforese capilar permite a separação de bandas pouco visíveis no método convencional de agarose, como os picos de $\beta 1$ (transferrina e hemopexina) e $\beta 2$ (complemento C3), resultando num padrão de 6 bandas. Estas características permitem um ganho adicional na avaliação de doentes com gamopatias monoclonais. A eletroforese capilar é particularmente mais sensível à deteção de componentes monoclonais em pequenas concentrações, especialmente IgA ou cadeias leves, que podem ou não ser detetadas pela técnica em gel de agarose, devido à co-migração com a transferrina e o C3(5,26).

v- Hydrasys 2 Focusing

É um equipamento semiautomático (Fig.26) com um sistema analítico multiparamétrico.

O equipamento destina-se à realização de técnicas de eletroforese e de imunofixação em gel de agarose, a partir de amostras biológicas (por exemplo soro, derrames de serosas, LCR e urina). A electroforese em gel de agarose (método convencional) baseia-se na diferença de mobilidade que as moléculas proteicas possuem, de acordo com as cargas elétricas próprias, tamanho e forma, gerando, em meio alcalino tamponado e num suporte poroso de gel de agarose, quando submetidas a um campo elétrico de corrente contínua durante um determinado intervalo de tempo, um eletroforetograma com diferentes frações proteicas, que se vão individualizando do cátodo para o ânodo (3).



Fig.26- Hydrasys 2

As principais utilizações deste aparelho no LJC e respetivo fundamento são:

- ✓ electroforese das lipoproteínas. As lipoproteínas, separadas, são coradas com um corante específico para lípidos, o sudão negro. As electroforeses resultantes podem ser analisadas visualmente ou ser avaliadas por densitometria, o que dá uma quantificação relativa e precisa de cada zona individualizada;
- ✓ imuno-electroforese sérica e urinária. As proteínas são separadas por electroforese em meio alcalino (pH 9,2) e depois imunoprecipitadas com antisoros de especificidades diferentes: anti-cadeias pesadas gama (Ig G), alfa (Ig A) e mu (Ig M), e anti-cadeias leves kapa e lambda (livres e ligadas). Após imunofixação, as proteínas imunoprecipitadas são coradas com corante específico. Os géis são analisados visualmente;
- ✓ pesquisa de proteínas Bence Jones. As proteínas são separadas por electroforese em meio alcalino (pH-9,2) e depois imunoprecipitadas com antisoros de especificidades diferentes: antisoro trivalente [anti-cadeias pesadas gama (Ig G), alfa (Ig A) e mu (Ig M)], anti-cadeias leves kapa e lambda (livres e ligadas) e anti-cadeias leves livres kapa e lambda. Após imunofixação, as proteínas precipitadas são coradas com corante específico;
- ✓ Separação e quantificação das Isoenzimas LDH, CK e fosfatase alcalina

B- Casos Laboratoriais

Caso 4

Informação Clínica: Homem de 55 anos com diabetes tipo II desloca-se ao laboratório para controlo trimestral dos seus resultados laboratoriais

Dados Laboratoriais

BIOQUÍMICA

	Resultados	Unidades	V.R.
Glicémia	153	mg/dL	70- 110
Hemoglobina A1c [NGSP]	8,0	%	4,3-6,1
HemoglobinaA1c[IFCC]	64	mmol/mol	<42
Glicémia média estimada	183	mg/dL	
Microalbuminúria (amostra ocasional)	7,19	mg/L	<20,0

Embora este já seja um caso estabelecido, o diagnóstico de diabetes mellitus (DM) é feito com base nos seguintes parâmetros e valores na população em geral:

- a) Glicémia em jejum ≥ 126 mg/dl (ou $\geq 7,0$ mmol/l); ou
- b) Sintomas clássicos + glicemia ocasional ≥ 200 mg/dl (ou $\geq 11,1$ mmol/l); ou
- c) Glicémia ≥ 200 mg/dl (ou $\geq 11,1$ mmol/l) às 2 horas, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO) com 75g de glicose; ou
- d) Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$.

(27)

A DM tipo 2 é a forma mais frequente de diabetes, resultando da existência de insulinopenia relativa, com maior ou menor grau de insulinorresistência. Corresponde a cerca de 90% de todos os casos de diabetes e, muitas vezes, está associada a obesidade, principalmente abdominal, a hipertensão arterial e a dislipidemia. A hemoglobina A1 C é o parâmetro mais importante na monitorização nos doentes com DM tipo II, pois reflete a quantidade média de glicémia durante os 2-3 meses precedentes (tempo de semi-vida dos GVs) (5).

O objetivo dos doentes diabéticos é manter o nível de glicémia o mais equilibrado possível de forma a minimizar as complicações provocadas por hiperglicémias constantes, como a lesão progressiva de diferentes órgãos (rins, olhos, sistema cardiovascular e nervos). O NICE (Nacional Institute for Clinical Excellence) e a ADA (American Diabetes Association) recomendam um valor de HbA1c $<7,0\%$ para controlo da diabetes tipo II. Um valor de HbA1c

de 8% como o do nosso caso, indica aumento do risco de complicações. O clínico pode considerar um ajuste no tratamento.

Do ponto de vista laboratorial é possível através do doseamento da microalbuminúria monitorizar uma das complicações crónicas da DM, a nefropatia diabética. A microalbuminúria é o termo usado para se referir a concentrações muito baixas de albumina (principal proteína) na urina e constituiu um indicador precoce de insuficiência renal. A presença de proteínas na urina (proteinúria) dá-se quase sempre quando o glomérulo ou os túbulos renais se encontram lesados (27).

Estudos demonstraram que a detecção precoce da doença renal através da microalbuminúria facilita tanto os doentes como os médicos a ajustar o tratamento para a diabetes. Resultados normais, como o do nosso doente indicam uma função renal normal; resultados aumentados indicam doença renal num estadio mais ou menos desenvolvido. Atualmente, dá-se preferência à dosagem em amostra ocasional de urina por ser mais prático e ter boa correlação com dosagens em urina de 24 horas. É recomendável o doseamento simultâneo da creatininúria na amostra com a finalidade corrigir possíveis variações na concentração da albuminúria (desidratação, diurese osmótica) (28).

Caso 5

Informação Clínica: Senhora de 55 anos sem informação clínica adicional. Apenas há registo que a médica quer avaliar a função hepática.

Dados Laboratoriais

BIOQUÍMICA

	Resultados	Unidades	V.R.
AST	673	U/L	<34
ALT	930	U/L	<49
Fosfatase alcalina	467	U/L	45-129
γ-GT	340	U/L	<73
LDH	867	U/L	230-460
Bilirrubinémia Total	4,71	mg/dL	0,30 – 1,20
Bilirrubinémia Directa	2,01	mg/dL	<0,30
Bilirrubina Indirecta	2,7	mg/dL	0,20-0,80
Proteína C-Reactiva	7,2	mg/dl	<1,00
Proteínas Totais	7,4	g/dL	6,4-8,0 g/dl

Os parâmetros bioquímicos mais utilizados como indicadores da função hepática são: as transaminases (AST e ALT), fosfatase alcalina, γ -GT, LDH e a bilirrubina total e directa.

As transaminases são enzimas intracelulares que existem em grande quantidade nos hepatócitos e como tal qualquer lesão ou doença que afecta o parênquima hepático libertará grandes quantidades das mesmas para a corrente sanguínea, elevando os seus níveis séricos. Embora ambas sejam consideradas como enzimas hepáticas, apenas a ALT é específica para o fígado. A doente apresenta níveis séricos de ALT e AST muito elevados, o que é indicativo de lesão hepatocelular compatível com uma hepatite aguda (transaminases > 200 UI/l e ALT > 2x AST) (3,5).

Devido à lesão dos hepatócitos, os níveis de LDH (enzima amplamente distribuída por todas as células do organismo) encontram-se também elevados, assim como os de fosfatase alcalina e γ -GT por inflamação/ e ou necrose dos ductos e canaliculos biliares. Embora a fosfatase alcalina e γ -GT apresentem melhor correlação com a obstrução e a colestase do que com o dano hepatocelular, é habitual estarem elevados em situações de hepatite (3) (5). A bilirrubina total também se encontra elevada. O aumento da bilirrubina indirecta está relacionado com a incapacidade dos hepatócitos lesados em conjugar a bilirrubina. Quanto à bilirrubina directa o seu aumento é explicado pelo bloqueio dos ductos biliares comprometidos por um processo inflamatório que ocorre na fase aguda da doença hepática. O processo inflamatório é comprovado pelos valores aumentados de PCR (3,5).

Os valores de proteínas totais encontram-se dentro dos níveis normais, o que é relativamente normal neste tipo de patologia. A diminuição das proteínas totais e o prolongamento do TP é mais habitual em situações crónicas como a cirrose hepática (3,5).

Face à suspeita de diagnóstico provável de hepatite devem ser investigadas causas específicas da doença. A causa de hepatite aguda é quase sempre viral, e como tal devem ser determinados os marcadores serológicos para a Hepatite A, B e C.

Caso 6

Informação Clínica:

Mulher de 65 anos, com oligúria realiza análises de urgência.

Dados Laboratoriais

BIOQUÍMICA

	Resultados	Unidades	V.R.
Urémia	80	mg/dl	<50
Creatininemia	1,93	mg/dl	0,50- 1,10
Ácido úrico	8,5	mg/dl	3,1-7,8
Ionograma			
Na+ (Sódio)	128	mmol/L	132-146
K+ (Potássio)	3,4	mmol/L	3,5- 5,5
Cl (Cloretos)	91	mmol/L	99,0-109,0
Proteína C-Reactiva	3,74	mg/dl	<1,00

Análise sumária da urina

Parâmetro	Resultado
Nitritos	Não revelou
pH	5,5
Proteínas	Não revelou
Glucose	Não revelou
Corpos cetónicos	Não revelou
Urobilinogénio	0,2mg/dL
Bilirrubina	Não revelou
Eritrócitos	+
Leucócitos	+
Densidade	1.014

Análise do sedimento urinário:

Raras células epiteliais (<5/campo);
Alguns leucócitos (16/campo)
Alguns eritrócitos (12/campo)

Este é um caso de patologia renal. Neste tipo de patologia ocorre, habitualmente, uma diminuição da filtração glomerular, uma diminuição da reabsorção tubular e/ou uma diminuição da excreção tubular, o que promove a acumulação de produtos usualmente excretados como os produtos azotados não proteicos (ureia, creatinina e ácido úrico) e permite a saída na urina de substâncias normalmente retidas pela reabsorção tubular (como é o caso das proteínas e glucose). Daí que os parâmetros laboratoriais, habitualmente, utilizados para avaliação da função renal sejam: creatininemia, taxa de filtração glomerular renal, urémia, uricémia e análise sumária da urina. O doseamento cálcio, fósforo e eletrólitos (sódio, potássio e cloretos) podem também ser pedido mas são mais usados para monitorizar doentes com lesão renal estabelecida (29).

Neste caso, o doente apresenta valores de creatinina e ureia aumentados o que pressupõem um comprometimento a nível renal, mais concretamente uma insuficiência renal aguda (aumento dos valores de creatinina > 50% sobre o valor basal) (3) (5).

A creatinina e a ureia são os principais parâmetros utilizados para avaliação da função renal, contudo, a creatinina é um parâmetro mais sensível e específico por ser um produto endógeno, produzido e eliminado nos fluidos biológicos de um modo constante e o facto dos seus níveis quer plasmáticos quer urinários se manterem entre limites estreitos permite que a sua *clearance* seja determinada como indicador taxa de filtração glomerular (TFG) - melhor indicador da função renal (5).

Embora os níveis de ácido úrico se encontrem também aumentados em caso de doença renal por diminuição da sua excreção, a sua utilidade maior relaciona-se com diagnóstico e acompanhamento de gota. A diminuição dos níveis de sódio e cloretos, neste caso, poderá estar relacionada com a incapacidade dos túbulos na reabsorção do filtrado glomerular, originando perda de electrólitos. A deteção de eritrócitos e leucócitos na análise sumária da urina indicia necrose tubular e também inflamação, a qual é evidenciada por um valor de PCR aumentado.

Caso 7

Informação Clínica:

Senhor de 54 anos que se dirige ao Laboratório para avaliação do perfil lipídico.

Dados Laboratoriais

BIOQUÍMICA

	Resultados	Unidades	V.R.
Colesterol Total	330	mg/dl	<190
Triglicéridos	246	mg/dl	<150
Colesterol HDL	52	mg/dl	35-55
Colesterol LDL	229	mg/dl	<100*

* Níveis ideais- os níveis dependem do número e do tipo dos fatores de risco presentes e da razão do exame
O diagnóstico das dislipidemias e avaliação do risco cardiovascular (RCV) realiza-se pela avaliação laboratorial do perfil lipídico que inclui: CT, TG, colesterol das HDL ("colesterol bom") e colesterol das LDL("colesterol mau") (30).

A principal utilidade destes parâmetros é:

- c-LDL – principal parâmetro para avaliação lipídica. As decisões de tratamento e monitorização de dislipidémias baseiam-se com frequência nestes níveis;
- CT- não é usado para diagnosticar ou caracterizar uma dislipidémia mas é considerado para avaliar o RCV;
- c-HDL- é solicitado como parte do perfil lipídico tendo particular interesse a sua monitorização em doentes com risco cardíaco aumentado;
- TG- adicionam informação sobre o RCV e são indicados para o diagnóstico e escolha de tratamento.

(30,31)

Os valores do doente confirmam o diagnóstico de dislipidémia, dado que o doente apresenta valores elevados de CT, LDL e TG. Contudo, é preciso ter em conta que em casos mais duvidosos o diagnóstico de dislipidemia deve ser confirmado por uma segunda avaliação laboratorial em jejum de 12-14 horas do CT, c-HDL e TG, realizada com um intervalo de mínimo de 4 semanas, antes de se iniciar qualquer terapêutica (30).

As dislipidémias são alterações da concentração dos lipídios no sangue, cujo seu aumento está relacionado com doenças ateroscleróticas (manifestação mais comum), doenças cardíacas e acidentes vasculares cerebrais (AVC) (3).

Existem outros parâmetros laboratoriais que podem ser solicitados para avaliação do RCV, nomeadamente: apolipoproteína A e B e Lipoproteína(a) mas que não evidenciam benefício clínico adicional. Vários estudos clínicos estabeleceram que pelo menos em indivíduos de alto risco, a redução de CT e de c-LDL está associada com uma redução clínica e estatisticamente significativa na mortalidade cardiovascular e por conseguinte são os principais alvos terapêuticos recomendados (30).

Mais recentemente estudos mostraram que a medida da PCR de alta sensibilidade (PCR-HS) pode ajudar a avaliação do RCV. Este teste é diferente do exame comum que mede a PCR, que detecta níveis elevados em pessoas com infecções e doenças inflamatórias. A PCR-HS mede níveis de PCR na faixa normal. Mostrou-se que níveis normais altos em pessoas saudáveis estão associados a aumento de RCV, mesmo quando os níveis de lipídios estão na faixa aceitável. Alguns especialistas afirmam que a melhor maneira para prever o RCV é combinar um bom marcador para inflamação, como a PCR-HS junto com o perfil lipídico (32).

3.1.3- Endocrinologia e Imunologia

A- Equipamentos, metodologias e parâmetros

i- ADVIA Centaur

O ADVIA Centaur (Fig.27) é um analisador automatizado de imunoensaios associado à tecnologia quimioluminescente e que permite a determinação de vários analitos (várias hormonas, Acs e marcadores tumorais).

A quimioluminescência consiste na emissão de luz quando um eletrão transita de um estado de energia mais elevado para um estado de energia mais baixo. A excitação eletrónica é causada por uma reação química e envolve a oxidação de um composto orgânico como por exemplo luminol, éster de acridina ou luciferina, por um oxidante, como o peróxido de hidrogénio, hipoclorito ou oxigénio. As principais vantagens desta tecnologia são: elevada sensibilidade (em muitos casos numa ordem de grandeza considerável relativamente aos radioimunoensaios), alto rendimento linear (emissão de luz tende a ser proporcional à concentração do analito em análise), rapidez e estabilidade (sinal é gerado em poucos segundos e pode permanecer por várias horas), baixas interferências de fundo; facilidade de automatização (3,5).

Este analisador utiliza como marcador quimioluminescente o éster de acridina, que é oxidado pelo peróxido de hidrogénio, maximizando a emissão de luz pela alteração do ambiente de ácido para básico. A luz é emitida pelo produto excitado formado durante a reação de oxidação e detetada por um tubo fotomultiplicador (33).



Fig.27- ADVIA Centaur

O equipamento utiliza diferentes tipos de métodos:

- *Sandwich*

A fase sólida é composta por partículas paramagnéticas marcadas com um anticorpo (Ac) específico (ou Ag (Ag) específico) para um determinado Ag (ou Ac) presente na amostra. Estabelece-se a ligação do Ag (ou Ac) à fase sólida. Após esta ligação adiciona-se um substrato marcado com éster de acridina (substrato quimioluminescente), que se liga especificamente ao Ag (ou Ac) da amostra. A concentração do analito presente na amostra é diretamente proporcional à emissão de luz. Os parâmetros determinados por este ensaio são: doseamento da Ferritina, paratormona (PTH), anticorpos (Acs) anti-HCV (vírus da hepatite C), Ac anti-HIV (vírus da imunodeficiência humana) e Ac anti-HAV Total (vírus da hepatite A) (33).

- Competitivo

Apresenta dois tipos:

- Ag marcado com éster de acridina compete com o Ag da amostra para os mesmos locais de ligação ao Ac que está ligado às micropartículas paramagnéticas;

- Ac marcado com éster de acridina para o qual vai competir o Ag da amostra e as micropartículas paramagnéticas revestidas com Ag.

Em ambos os tipos, a concentração do analito é inversamente proporcional à quantidade de luz emitida. Parâmetros determinados por este ensaio: doseamento do Cortisol, Progesterona, Digoxina e Testosterona (33).

- Imunocaptura

Captura dos Acs presentes na amostra através de um Ac monoclonal específico que reveste a fase sólida. Parâmetros determinados por este ensaio: doseamento do Ac anti-HBc IgM e Ac anti-HAV IgM (33).

ii- IMMULITE 2000

O IMMULITE 2000 (Fig.28) é um analisador que executa imunoensaios quimioluminescentes de forma automatizada mas com um princípio diferente do Advia Centaur. Este sistema utiliza, como fase sólida, esferas de poliestireno revestidas com Acs ou Ags específicos de cada ensaio. O analito é marcado com fosfatase alcalina (ALP), cuja ligação é quantificada utilizando o substrato de dioxetano quimioluminescente. A emissão de luz é detetada pelo tubo fotomultiplicador e os resultados são calculados para cada amostra. A quantidade de

ALP ligada é diretamente proporcional (para um ensaio do tipo *sandwich*) ou inversamente proporcional (para um ensaio competitivo) à concentração do analito na amostra do doente.



Fig.28- IMMULITE 2000

iii- cobas e 411

O cobas e 411 (Fig.29) é um autoanalisador que permite realizar imunoensaios através da tecnologia de electroquimioluminescência (ECL).

A ECL recorre a duas espécies reativas, a tripropilamina como iniciador das reações redox e o complexo ruténio(3)-tris(bipiridil) $[Ru(bpy)_3]^2$ como marcador quimioluminescente. Na superfície de um eléctrodo de prata e sob ação de um campo eléctrico a tripropilamina é oxidada resultando num radical tripropilamina e o complexo de ruténio é oxidado à forma $[Ru(bpy)_3]^{3+}$. O radical tripropilamina e o $[Ru(bpy)_3]^{3+}$ reagem um com o outro, o que provoca a redução deste último a $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ ao mesmo tempo que forma um estado excitado através da transferência de energia. Este estado excitado é instável e decai para o seu estado original, emitindo um fotão a 620 nm, que é medido por um tubo fotomultiplicador (34).

A grande diferença entre a quimioluminescência e a ECL é que na primeira a indução ao estado excitado é causada por uma reacção química envolvendo um composto orgânico e na segunda é causada por uma reacção electroquímica gerada a partir de um composto estável na superfície de um eléctrodo.



Fig.29- cobas e 411

B- Técnicas Manuais

i- RPR (*Rapid Plasma Reagin*)

O RPR é um teste rápido de aglutinação não específico para pesquisa de anticorpos anti-*Treponema pallidum*. O RPR é uma forma modificada do VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*) clássico. O reagente contém um antígeno fosfolípido (cardiolipina) fortificado com lecitina e colesterol, associados a uma partícula coloidal que na presença de Acs na amostra originam uma aglutinação com “flocos” negros (5).

Os testes serológicos para diagnóstico indirecto de Sífilis são divididos:

- testes não treponémicos (Ex. RPR) – são testes não específicos que detetam Acs do tipo IgM e IgG, que aparecem como consequência reativa às substâncias fosfolípicas libertadas na destruição tecidual do endotélio vascular durante a infeção ou como resposta à cardiolipina e a lipoproteínas que são elementos estruturais libertados pelo *T. pallidum*;
- testes treponémicos- são testes mais específicos(ex. TPHA(*Treponema pallidum* hemaglutinação),FTA-ABS(*Fluorescent treponemal antibody absorption*) e ensaio treponémico imunoenzimático) que detectam Acs anti- *T. pallidum*.

(3)

Embora os testes não treponémicos sejam usados fundamentalmente no rastreio de doentes e na monitorização da resposta terapêutica durante o tratamento para a sífilis, a sua utilização não é recomendada. Daí que um resultado positivo isolado de RPR, sem histórico de patologia, deva ser sempre confirmado por métodos específicos como o TPHA e FTA-ABS (3).

ii- Reacção de Paul-Bunnet

O teste Paul-Bunnet é um teste rápido de aglutinação para pesquisa de Ac heterófilos da Mononucleose Infecciosa (MI). Durante a fase aguda da doença, os Ac IgM heterófilos da MI aparecem em 80-90% dos casos. Quando a reacção de Paul-Bunnet é negativa deve se considerar:

- se forte suspeita de MI, a determinação do Ac-anti VCA (Ag da cápside viral) é o teste mais específico em quase 100% dos casos;
- possibilidade de uma infecção por citomegalovírus que é a maior causa de mononucleose heterófila-negativa;
- outras possibilidades consoante a clínica.

(3,35)

iii- Antígenos febris

Os Ags febris são suspensões normalizadas de bactérias utilizadas em testes de aglutinação, identificando Acs específicos que se desenvolvem em algumas infeções febris. Estes testes são aplicações serológicas para as reações clássicas da Reação de Widal para detectar Ac anti-*Salmonella spp.* da Febre Tifóide, Reação de Weil-Felix para detetar Acs anti-Rickettsias e Reacção de Wright e Rosa Bengala para pesquisa de Acs anti-*Brucella spp.*

Os resultados positivos nestes testes não devem ser considerados prova de infecção por um microrganismo particular, uma vez que alguns dos testes apresentam Ag comuns, como acontece com a Reação de Weil-Felix. Os resultados positivos devem ser semiquantificados pelo método de diluições sucessivas. Segundo os critérios de interpretação estabelecidos, só devem ser considerados positivos títulos > 1:80 para a Febre tifóide e Brucelose e >160 para as Rickettsioses (35).

C- Casos Laboratoriais

Caso 8

Informação Clínica: Senhora de 50 anos que se dirige ao Laboratório para monitorização da função tiroideia.

Dados Laboratoriais

ENDROCRINOLOGIA / IMUNOLOGIA

	Resultados	Unidades	V.R.
TSH	11,2	mUI/L	0,350- 5,500
T4 Livre(T4L)	0,70	ng/dL	0,80-1,76
Ac- anti-tiroglobulina (Anti-Tg)	1785	UI/mL	<40
Ac-Anti-peroxidase(Anti-TPO)	245	UI/mL	<35

Este é um caso típico de hipotireoidismo primário autoimune que cursa com TSH elevada, T4L diminuído e Acs anti-tiroideus positivos. A tireoidite de Hashimoto é a causa mais comum de hipotireoidismo em países onde foi eliminada a carência de iodo. É um distúrbio autoimune em que são produzidos Acs que provocam inflamação e destruição da tireoide, resultando em diminuição da produção das hormonas tiroideias. Como os níveis de TSH e T4 Livre (T4L) não

estão regularizados, haverá necessidade da parte do clínico em ajustar a dose do tratamento (3,5).

A avaliação da função tiroideia deve ser realizada, principalmente, pelo doseamento da TSH juntamente com a T4L. Ambas as determinações são importantes no despiste das disfunções tiroideias (hipo e hipertiroidismo) e na monitorização do seu tratamento. Em casos mais complexos (maior dificuldade diagnóstica ou maior gravidade clínica) pode adicionar-se a determinação do T3 total (36).

Existem outros exames laboratoriais que podem ser prescritos:

- A determinação dos Acs antiperoxidase (ATPO) e antitiroglobulina (ATg) pode ser efetuada nas situações de hipotiroidismo primário, quando se suspeita de causa autoimune;
- A determinação dos Acs antirreceptor da TSH (TRAb's) pode ser realizada nas situações de hipertiroidismo;
- O doseamento de tiroglobulina não está indicado na avaliação diagnóstica dos nódulos da tiroide, estando reservado ao seguimento pós-tiroidectomia dos doentes com carcinomas da tiroide. Nestes casos pode associar-se a determinação dos ATg para uma correta interpretação dos valores da tiroglobulina;
- O doseamento da calcitonina, está recomendado quando existir uma suspeita clínica de carcinoma da tiroide ou em indivíduos pertencentes a famílias com a patologia.

(36) (37)

Considera-se como hipotiroidismo primário as situações que cursam com TSH elevada e T4L e/ou T3 diminuídas (hipotiroidismo clínico) ou TSH elevada e T4L e/ou T3 dentro dos valores de referência (hipotiroidismo subclínico) (36).

Considera-se como hipotiroidismo secundário (causa hipotálamo-hipofisária) as situações que cursam com T4L e/ou T3 diminuídas ou no limite inferior do normal com TSH baixa, normal ou ligeiramente elevada (neste caso pode ser difícil fazer o diagnóstico diferencial com hipotiroidismo primário) (36).

Considera-se como hipertiroidismo as situações que cursam com TSH suprimida e T4L e/ou T3 normais (hipertiroidismo subclínico) ou TSH suprimida e T4L e/ou T3 aumentadas (hipertiroidismo clínico) (36).

Caso 9

Informação Clínica: Senhor de 69 anos que se dirige ao Laboratório para monitorização do PSA após braquiterapia.

Dados Laboratoriais

ENDROCRINOLOGIA / IMUNOLOGIA

	Resultados	Unidades	V.R.	Resultados anteriores
PSA Total	0,02	ng/mL	<4,5 (60-69 A)	26,901

Nestes resultados verificamos que o doente apresenta um resultado residual de antígeno específico da próstata (PSA Total) o que está em conformidade com o tratamento cirúrgico prévio à próstata. Observa-se, também, um valor anterior muito aumentado (26,901) o que terá levado o clínico a encaminhar o doente para a realização da braquiterapia para tratar o tumor na próstata.

É importante saber que o PSA tem baixa especificidade para diagnóstico de carcinoma da próstata, podendo aumentar significativamente em situações como hiperplasia benigna e prostatite. A sua indicação é na monitorização de utentes com tumor da próstata após tratamento. Para rastreio oportunístico (detecção precoce) devem ser incluídos os utentes assintomáticos com idades compreendidas entre 55 e os 70 anos. Os homens com risco elevado (historia familiar de cancro na próstata) podem fazê-lo a partir dos 45 anos (38).

Podem ser solicitados outros exames laboratoriais complementares como o PSA Livre e a relação PSA Livre/Total. Esta relação deve ser pedida quando o resultado do PSA Total se encontra entre 4 e 10 ng/mL e tem a finalidade de discriminar aumentos de PSA devidos a hiperplasia benigna da próstata e carcinoma da próstata. Uma relação >0,20 é sugestiva de hiperplasia benigna da próstata (39).

Um homem com um valor de PSA Total > 10-ng/mL ou um valor de PSA entre 4-10-ng/mL com % PSA livre < 25 deve ser referenciado para realização de biópsia (38).

Caso 10

Informação Clínica: Senhor de 41 anos. Sem mais informação clínica.

Dados Laboratoriais

BIOQUIMICA

	Resultados	Unidades	V.R.
AST	24	U/L	<34
ALT	16	U/L	<49
γ-GT	11	U/L	<73
Bilirrubinémia Total	0,70	mg/dL	0,30 – 1,20
Bilirrubinémia Directa	0,26	mg/dL	<0,30

IMUNOSEROLOGIA

	Resultados	Unidades	V.R.
AgHBs	Negativo (0,1)	Index	Negativo: <1,0 Reativo: ≥1,0
Ac Anti- HIV 1/2 (teste de 4ª geração)	Não Reativo (0,2)	Index	Não Reactivo: <1,0 Reativo: ≥1,0
Ac Anti-HCV	Reativo(>11,0)	Index	Não reativo: <0,8 Indeterminado: 0,8-1,0 Reativo: ≥1,0

As doenças infecto-contagiosas, como a Hepatite B e C e a SIDA têm vindo a reassumir relevância crescente a nível europeu e mundial. O seu despiste, principalmente, em pessoas de risco é muito importante em termos de saúde pública para a sua vigilância, controlo e prevenção.

Este doente apresenta um valor negativo para o principal marcador da Hepatite B, o Ag HBS (antigénio de superfície), o que nos permite excluir com alguma precisão uma fase aguda da doença. Existem mais marcadores nomeadamente Ac HBs, Ac HBc, AgHBE e Ac HBE, que auxiliam a determinar em que estadio da doença o doente se pode encontrar.

Relativamente ao HIV, um resultado não reativo para os Acs anti-HIV 1/2 com um teste de 4ª geração pressupõem que não está infectado com o vírus. Os testes de 4ª geração pesquisam em simultâneo Acs anti-VIH 1 e anti-VIH 2 e o antigénio p24 apresentando uma excelente sensibilidade (99,78%-100%) e especificidade (99,5%-99,93%). Um resultado reactivo deve levar a uma repetição em duplicado. No caso do resultado se manter reactivo, deve ser confirmado por método de "imunoblot". A quantificação da carga viral por métodos moleculares é importante para decisão terapêutica e monitorização do tratamento (40).

O doente apresenta um resultado reactivo para os Acs. HCV que deve ser confirmado por método de "imunoblot" com proteínas recombinantes (RIBA). Se o resultado for positivo deve ser feito um teste molecular para a pesquisa e quantificação de ácido ribonucleico (RNA) do HCV. Um RNA HCV positivo indica infeção activa devendo o doente iniciar tratamento e fazer quantificação da carga viral para monitorização da eficácia do mesmo. Os resultados normais das enzimas hepáticas do nosso doente, leva-nos a pensar que se trata de uma situação de hepatite C já conhecida ou infeção em fase viral não replicativa (41).

3. 2. RADIOIMUNOENSAIO (RIA)

No departamento RIA é feito o estudo bioquímico e avaliação funcional dos eixos endocrinológicos (8).

A- Equipamentos, metodologias e parâmetros

i- Contador de Raios Gama *Wallac Wizard 1470 (Perkin Elmer)*

O Contador de Raios Gama *Wallac Wizard 1470* (Fig.30) deteta e quantifica raios gama emitidos pelos isótopos radioativos utilizados na tecnologia RIA.

Os isótopos usados devem possuir um certo número de características para a sua utilização em RIA, tais como, actividade específica elevada, produção alta de energia, semi-vida adequada, ser de fácil obtenção. Um dos isótopos mais frequentemente usados é o ^{125}I (emite radiação gama), mas também pode ser usado o ^{14}C ou o trítio (^3H) (emitem radiação beta) (4).



Fig.30- Contador Raios Gama *Wallac Wizard 1470 (Perkin Elmer)*

Existem 2 tipos principais de métodos: o RIA clássico que é competitivo e o ensaio imunoradiométrico (IRMA) não competitivo.

No RIA clássico o Ag é marcado com um isótopo radioativo (Ag^*) que compete com o Ag presente na amostra (Ag) pela ligação ao Ac anti-analito que reveste o tubo do ensaio. Dado que a concentração de Ag marcado e de Ac nos tubos é fixa, a razão $[\text{Ag}^*\text{-Ac}]/[\text{Ag}^*]$ diminui à medida que aumenta a $[\text{Ag}]$ livre. Por isso, a quantidade de Ag^* ligada ao Ac é inversamente proporcional à $[\text{Ag}]$ presente na amostra (4).

No IRMA utiliza-se o Ac marcado com o isótopo radioactivo (Ac^*). A reacção envolvida é do tipo *sandwich*, usando dois Acs específicos para o Ag a dosear. Regra geral, o Ac encontra-se associado a uma fase sólida (em esferas ou revestindo os tubos de reacção), formando um complexo com o Ag. O Ac marcado (Ac^*) é adicionado posteriormente para reagir com o complexo Ag-Ac. As concentrações do Ac e Ac^* são constantes, logo a $[\text{Ag}]$ variam na razão direta do complexo Ac-Ag-Ac^* (4).

A RIA combina a elevada especificidade das reacções imunológicas, com a elevada sensibilidade da detecção pela utilização de radioisótopos permitindo assim quantificar analitos em concentrações muito baixas. Contudo apresenta algumas desvantagens tais como: custo elevado, tempo de execução demorado, monitorização da radiação, validade dos reagentes devido ao decaimento radioactivo (3).

Os parâmetros habitualmente realizados com esta tecnologia são mais específicos e incluem: 17-OH Progesterona, Acs anti-canais de cálcio, Acs anti-GAD2, Acs anti- IA2, Acs anti receptores da acetilcolina, Ácidos biliares conjugados, Vasopressina-ADH, Aldosterona, Actividade Renina Plasmática-ARP, melatonina, testosterona livre, Cromogranina A e B entre outros.

3. 3 ALERGOLOGIA

Nesta área analítica é realizado o estudo laboratorial da doença alérgica e das atopias.

A- Equipamentos, metodologias e parâmetros

i- Equipamentos UniCAP 100 e 250

Os equipamentos UniCAP utilizam fluoroimunoensaios do tipo *sandwich* que usa o alérgeneo de interesse acoplado covalentemente a uma fase sólida (CAP) e um Ac anti-IgE específico marcado com a enzima β -galactosidase que vai degradar o substrato -4-metilumbelifenil- β -D-galactosido, originando um produto fluorescente o 4-metil-umbeliferona emitindo fluorescência. O sinal fluorescente é convertido numa concentração de IgE específica através de uma curva de calibração (sinal *versus* concentração). Esta tecnologia diferencia-se de outras pela alta pureza e capacidade de fixação do alérgénio à matriz (38).

As determinações analíticas efetuadas são:

- *IgE total*- auxilia no diagnóstico diferencial quando há suspeita de esofagite eosinofílica; alergia ocupacional de causa não esclarecida; aspergilose pulmonar alérgica; sinusite alérgica por fungos; parasitoses intestinais e cutâneas, entre outras.
- *IgE específica* para vários alérgenos: Ácaros; Pó da Casa; Pólens de Gramíneas, Ervas daninhas e Árvores, Epitélios de animais, Alimentos; Fungos venenos, entre outros);
- *Phadiatop* inalante- consiste no despiste dos principais alérgenos inalantes responsáveis por sintomas comuns como rinites, conjuntivites, sinusites e asma, para identificação preliminar de doentes atópicos;
- *Phadiatop alimentar*- consiste no despiste de um conjunto de alérgenos alimentares;
- *IgG específica*: na doença alérgica, é usado como marcador de exposição em diversas doenças pulmonares, tais como alveolite alérgica, aspergiloma e aspergilose. Na monitorização da imunoterapia, níveis aumentados de IgG específicos revelam uma correlação geral (mas não definitiva) com o resultado clínico e que o sistema imunitário está a reagir à terapia;
- *IgG4 específica* : determinação de Acs IgG4 específicos no soro ou plasma humanos. Na imunoterapia de monitorização verificam-se níveis aumentados de IgG4 específica. Os

Acs IgG4 específicos contra alergénios, podem desempenhar funções no desvio imunológico e no desenvolvimento de tolerância.

- *Triptase*: é um teste *in vitro* para a avaliação da triptase no soro e plasma humanos;
- *Proteína catiónica do eosinófilo (ECP)*: para determinação da proteína catiónica do eosinófilo (ECP) no soro humano

(38,39)

As reacções de hipersensibilidade podem ser alérgicas ou não alérgicas. Quando existe alergia, essa reactividade anormal do sistema imunitário pode envolver mecanismos mediados por IgE ou mecanismos de outros tipos (IgG, células T). Para rastreio inicial da doença alérgica, deve prescrever-se IgE específico para uma mistura de alergénios inalantes e/ou alimentares, de diferentes grupos num único teste, na impossibilidade de realizar testes cutâneos por picada (39).

Em doentes com história clínica sugestiva de patologia alérgica, a prescrição de IgE específicos isolados deve ser efetuada nos seguintes casos: confirmação de diagnóstico clínico, impossibilidade de realização de testes cutâneos, confirmação da suspeita diagnóstica quando os testes cutâneos são negativos, monitorização da aquisição de tolerância natural (ex: alergia alimentar) ou da resposta à terapêutica de dessensibilização específica (39).

3.4- QUÍMICA ANALÍTICA

No departamento Química Analítica é realizado: o estudo laboratorial de metabolitos, hormonas, vitaminas, elementos traço, neurotransmissores, metais pesados e outros bioconstituintes através do recurso a sistemas analíticos próprios; confirmação da presença de drogas ilícitas em diversos produtos biológicos; monitorização de fármacos e identificação dos seus metabolitos; análise físico-química e espectroscópica do cálculo urinário, vesículo-biliar e prostático (8).

A- Equipamentos, metodologias e parâmetros

i- Cromatografo para Cromatografia Líquida de Alta Definição (HPLC)

A HPLC é o processo através do qual uma mistura de compostos é separada nos seus constituintes, utilizando uma fase líquida móvel sob pressão, utilizando colunas com enchimentos de partículas de dimensões reduzidas e com sistemas de deteção contínua do eluído. A separação baseia-se não só na relação entre a solubilidade dos solutos nas duas fases, mas também na sua interação com a fase estacionária. As condições ótimas de

separação requerem o conhecimento das propriedades físicas dos componentes em questão (ex. volatilidade, solubilidade, etc.) assim como o das propriedades químicas que tornam possível a sua detecção (ex. fluorescência, absorção no UV, atividade electroquímica) (3).

Em relação à cromatografia líquida clássica esta apresenta a possibilidade de separações com elevada resolução e em tempos relativamente curtos. Em comparação com a cromatografia gasosa apresenta a vantagem de proporcionar uma maior eficiência de separação, de operar a temperaturas inferiores, sendo de grande aplicação em separações de espécies macromoleculares e biológicas de reduzida estabilidade e a recuperação dos componentes separados também é mais fácil. Tem reduzida aplicação com compostos voláteis (3).

O sistema de HPLC (Fig.31) usado na secção de química analítica do LJC realiza-se geralmente em coluna de fase reversa (os grupos funcionais da fase estacionária são apolares) em sistema isocrático ou gradiente de solventes (ex. quantificação de aminoácidos), cuja detecção varia consoante o parâmetro que queremos determinar.



Fig.31- Cromatógrafo utilizado para realização de HPLC

Por exemplo, os aminoácidos, as vitaminas B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B6 (piridoxina) e o triptofano/GABA/taurina são efetuados com detecção por fluorescência, para a amiodarona, os antidepressivos tricíclicos, os antiepilépticos, as benzodiazepinas, os carotenos, os corticosteróides plasmáticos, a hidroxiprolina, as sulfonilureias e as vitaminas A (retinol), E (α -tocoferol) e D (colecalfiferol) é usada a detecção espectrofotométrica no visível a diferentes comprimentos de onda e para as catecolaminas, as metanefrinas, o ácido vanilmandélico, o ácido homovanílico, o ácido 5-hidroxiindolacético e a serotonina é usada a detecção electroquímica, após extração da amostra por extração em fase sólida.

O processo de derivatização, isto é, processo através qual um analito é quimicamente modificado para ser mais facilmente detetável ou separável é geralmente feito antes da

amostra ser aplicada na coluna, à exceção da vitamina B6 cuja derivatização é feita na coluna pela própria fase móvel.

ii- Cromatógrafo para cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

A cromatografia gasosa (GC) permite a separação de substâncias, naturalmente voláteis ou que podem ser facilmente convertidas numa forma volátil, arrastadas por um gás através de uma fase estacionária. O GC tem sido utilizado por décadas devido à sua alta resolução, baixos limites de detecção, precisão e tempo analítico curto. No HPLC o que faz variar os tempos de retenção e provocar a separação dos analitos é a sua afinidade para a fase móvel e fase estacionária. No GC a fase móvel é um gás inerte ou seja não reativo e o que vai promover a separação dos analitos na amostra é o programa de temperaturas (3).

Na espectrofotometria de massa, cada composto é fragmentado em iões criando um padrão único que funciona como uma impressão digital desse composto. O espectro obtido é comparado com outros de compostos conhecidos (biblioteca). As substâncias que não se encontrem nas bibliotecas pode-se sempre chegar por analogia à estrutura provável da molécula ou família (3).

A cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massa (GC-MS) (fig.32) é um método analítico que combina as características de cromatografia gasosa e da espectrofotometria de massa para identificar substâncias diferentes dentro de uma amostra. É muito sensível e específico e usado como referência para confirmação de resultados em outras tecnologias. É habitualmente usado no LJC para determinação de cotinina e nicotina na urina, cocaína, LSD, opiáceos, anfetaminas e canabinóides no soro e na urina.



Fig.32- Cromatógrafo utilizado para realização de GC-MS

iii- Espectrofotômetro de Infravermelho Perkin-Elmer FT-IR

A espectrofotometria de absorção no infravermelho é uma metodologia utilizada no LJC para determinar a composição química dos cálculos renais e biliares (Fig.33). Os grupos funcionais compreendidos na molécula, bem como a configuração geral dos átomos desta, apresentam uma multiplicidade de vibrações que ocorrem simultaneamente e originam um espectro de absorção extremamente complexo que lhes são característicos. Por interação com a radiação infravermelha para determinados comprimentos de onda, uma parte da radiação incidente é absorvida. A absorção ou ausência de absorção de radiação infravermelha incidente relaciona-se com vibrações específicas de alongamento e deformação, assim como, em alguns casos, com as relações entre os respectivos grupos funcionais e o resto da molécula (3,40).

Fazendo a interpretação do espectro e pela sua comparação com um atlas de espectros puros, é possível estabelecer a presença ou ausência de certos grupos funcionais e identificar a natureza do cálculo.



Fig33.- Espectrofotômetro de Infravermelho Perkin-Elmer FT-IR

iv- Espectrofotômetro de Absorção Atômica Shimadzu Modelo AA 6800

A Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA) é uma técnica analítica de detecção qualitativa e determinação quantitativa de determinados elementos, recorrendo à absorção de radiação pelos átomos no seu estado gasoso. A sua elevada sensibilidade, torna este método adequado para a análise de microelementos ou elementos vestigiais, presentes como impurezas ou como componentes normais de amostras. Quando a radiação com um comprimento de onda adequado incide num grupo de átomos livres, no seu estado fundamental, os átomos podem absorver essa radiação, passando estes para um estado excitado- Absorção Atômica. Através da medição da quantidade de radiação absorvida pode-se determinar quantitativamente o elemento presente (3).

A EAA pode ser por chama ou em câmara de grafite, sendo este último o usado no LJC. Este método apresenta maior sensibilidade comparativamente à fotometria de chama, precisão na gama dos ppb ($\mu\text{g/L}$) e necessita de volumes de amostra pequenos.

No equipamento (Fig.34) procede-se à determinação de alumínio (s), chumbo (u) e no sangue total, selénio(s), cobre(u), cádmio no sangue total, crómio(s /u), mercúrio no sangue total e na urina e níquel (s/u). É constituído pelo *autosampler*, pelo gerador de vapor e pelo forno de grafite. No caso do doseamento do mercúrio recorre-se ao Gerador de Vapor de Hidretos para produzir o vapor de mercúrio, uma vez que este elemento tem a particularidade de em solução aquosa ser vaporizado a mercúrio livre, na presença de agentes redutores. A medição da absorção atómica é feita sem aquecimento deste elemento, o processo passa-se então a frio.



Fig.34- Espectrofotómetro de Absorção Atómica Shimadzu Modelo AA 6800

v- Varian Vista MPX- Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma indutivamente Acoplado (ICP OES)

A ICP OES é amplamente utilizada para análise elementar, principalmente por causa da sua característica multielementar, boa sensibilidade e ampla faixa linear dinâmica da curva de calibração (3).

A fonte de energia que assegura a passagem das amostras líquidas ao estado de vapor atómico é o plasma, sendo este por definição um volume luminoso de um gás raro parcialmente ionizado, facto que lhe confere propriedades de condutor da corrente eléctrica. O plasma utilizado é de árgon e pode atingir temperaturas de 10000 K. A amostra é introduzida no equipamento (Fig.32) num dispositivo designado de TOCHA onde é produzido o plasma, ocorrendo, instantaneamente, a atomização e a excitação dos átomos aí presentes, com emissão de radiação proveniente do retorno das espécies excitadas ao seu estado fundamental. O feixe de radiação emitida é convertido em corrente eléctrica através de fotomultiplicadores, sendo este sinal relacionado com a concentração do analito.

Este método constitui uma opção para a detecção de elementos que não se podem determinar por EAA ou para determinação de vários elementos numa só amostra.



Fig.35- Varian Vista MPX – ICP/OES

vi- HeliFAN- detecção de *Helicobacter pylori*

O HeliFAN (Fig.33) é um equipamento utilizado para a medição do carbono ^{13}C presente em amostras respiratórias para deteção de *Helicobacter pylori*.

O teste respiratório da ureia- ^{13}C utilizado no LJC é o Pylobactell. Neste teste é solicitado ao utente que ingira uma refeição teste, seguida da recolha de 3 amostras do ar que expira, para dosear a quantidade normal de ^{13}C que existe no CO_2 expirado. De seguida, o utente ingere a solução de ureia- ^{13}C Pylobactell, aguarda 30 minutos e efectua-se nova recolha de 3 amostras do ar expirado. Quando a bactéria *H. pylori* está presente e activa no estômago, vai decompor a ureia- ^{13}C , o que será detectado no CO_2 expirado. O aumento significativo de ^{13}C nestas amostras quando comparadas com as de nível normal, sugerem que a bactéria está presente e activa (41).



Fig.36-HeliFAN

3.5- MICROBIOLOGIA

Neste departamento é feito o estudo laboratorial das doenças infecciosas de etiologia bacteriana, micológica e parasitológica, através do exame morfológico directo, do exame cultural, isolamento, identificação e determinação da resistência aos agentes antimicrobianos, dos microrganismos presentes em diferentes amostras biológicas. É também feita a monitorização da eficácia da terapêutica antibiótica (8).

A secção de Microbiologia encontra-se isolada das restantes áreas do LJC para evitar ao máximo contaminações. A organização do espaço nesta área é muito importante. As amostras biológicas quando chegam ao sector passam inicialmente por uma zona de triagem, depois seguem para a sala com câmaras de segurança biológica com fluxo vertical, onde os produtos são semeados em meios de cultura e incubados em estufas apropriadas. A valorização dos crescimentos microbianos são efetuados na sala central onde também são realizadas as provas de identificação e teste de sensibilidade a antibióticos (TSA). O fluxo de trabalho organiza-se de forma a respeitar o princípio da “marcha em frente”.

A- Equipamentos e metodologias

i- Sysmex UF-1000i

Este equipamento, já descrito anteriormente na área da Bioquímica, usa a citometria de fluxo fluorescente com laser semi-condutor, combinada com a impedância, permitindo a diferenciação de elementos celulares (células, eritrócitos e leucócitos) presentes em amostras de urina para urocultura. Como possui também um canal específico para contagem de bactérias permite fazer um primeiro despiste sobre que urinas devem seguir para exame cultural.

Os critérios gerais para sementeira de urocultura são: amostras de urina que tenham resultados de leucócitos > 20 WBC/ μ L bem como todas as amostras de urina com bactérias > 500 BACT/ μ L, urinas de bebés colhidas em saquinho e de todas as amostras processadas em regime de urgência.

ii- Sistema VITEK2

O Sistema Vitek 2 (Fig.37) utiliza a tecnologia colorimétrica avançada para identificação microbiana rápida e segura e realização de TSA através da monitorização contínua do crescimento e da atividade do microrganismo no interior de cartas específicas (42).

Existem cartas para identificação da maior parte dos cocos Gram positivo de interesse clínico; para identificação da maioria dos bacilos Gram negativo fermentadores e não fermentadores; para identificação de leveduras e para identificação de *Neisseria spp.*, *Haemophilus spp.*, *Campylobacter spp.* e *Gardnerella vaginalis*. Cada carta baseia-se em métodos bioquímicos

estabelecidos e em substratos que medem a utilização das fontes de carbono, atividade enzimática e resistência. Os resultados finais estão disponíveis em cerca de 10h, baseados nas reações químicas e na base de dados do próprio sistema (42).

Estas cartas permitem um maior nível de automatização, não requerem a adição de reagentes e são seladas para uma maior segurança. São realizadas leituras cinéticas de 15 em 15 min para otimização do tempo de resposta. Permitem a identificação de cerca de 98% dos microrganismos isolados na rotina com eficaz discriminação entre espécies, utilizam mais de 600 substratos colorimétricos, e permitem reduzir o número de testes suplementares (42).

O TSA do VITEK2 consiste num sistema automatizado baseado na concentração inibitória mínima (CIM). É um sistema miniaturizado e uma versão simplificada da técnica da dupla diluição para a determinação das CIM pelo método da microdiluição. Cada carta para TSA é constituída por micropoços com uma determinada quantidade de um agente antimicrobiano associado ao meio de cultura. O aparelho monitoriza o crescimento em cada poço durante um determinado período de tempo (até 18h). No final da incubação é calculado a CIM para cada antimicrobiano da carta à qual corresponde uma interpretação de sensível, intermédio ou resistente (42).

Este equipamento possui um software de interpretação dos resultados que engloba várias referências bibliográficas. Efectua a validação automática dos resultados obtidos comparando a identificação e o antibiograma, e identifica os mecanismos de resistência associados a cada microrganismo. A detecção e interpretação de mecanismos de resistência é crucial para prevenir a falha da terapêutica, o uso indiscriminado dos antibióticos e a monitorização das infecções nosocomiais (42).



Fig.37- ViteK 2

iii- BacT/ALERT

O BacT/ALERT 3D 60 (Fig.38) é um sistema automatizado de incubação, agitação e monitorização de hemoculturas que deteta a presença de microrganismos pela produção de CO₂. As garrafas de hemocultura usadas podem ser para pesquisa de aeróbios (mais frequente) ou anaeróbios (43).

Quando presentes na amostra, os microrganismos metabolizam os substratos existentes no meio de cultura produzindo CO₂ originando a mudança de cor do sensor existente no fundo de cada frasco de hemocultura. Se o nível de CO₂ não se alterar significativamente após um determinado número de dias, a amostra é considerada negativa. As amostras consideradas negativas deverão ser expressas como estéreis e as amostras consideradas positivas devem realizar a identificação do microrganismo e TSA (43).



Fig.38- BacT/ALERT 3D

iv- OC Sensor

Este analisador (Fig.39) destina-se à pesquisa de sangue oculto nas fezes (PSOF) de forma automatizada, utilizando como metodologia a aglutinação de látex por imunoturbidimetria. São utilizadas partículas de latex revestidas com Acs específicos que reagem com a Hb humana formando imunocomplexos. A turvação originada pela aglutinação Ag (hemoglobina humana)-Ac é detetada fotometricamente(660 nm). A luz diretamente transmitida através do meio, ou seja, a luz não difratada, é determinada, sendo a intensidade da turvação diretamente proporcional à concentração do analito presente (44).

A PSOF permite identificar a presença de pequenas quantidades de sangue nas fezes que podem resultar do sangramento de tumores ou de pólipos no colón e reto. É recomendado em Portugal o rastreio do cancro colorretal a toda a população entre os 50 e os 74 anos de idade (45).

Devido ao facto dos tumores do intestino não originarem sangramento todos os dias ou a quantidade de sangue perdida ser muito reduzida, a probabilidade de falsos-negativos é elevada pelo que se aconselha a repetição do teste a cada ano. Quando o resultado é positivo é necessário realizar uma colonoscopia no prazo máximo de 8 semanas, para se descobrir a

origem do sangramento. De notar que existem condições benignas, como a doença hemorroidária, que pode originar um resultado positivo. É sempre importante que um resultado positivo seja interpretado pelo médico assistente (45).



Fig.39- OC Sensor- Biogen Diagnóstica

B- Meios de cultura

Em microbiologia, os meios de cultura tem um papel fundamental, uma vez que, devem ser escolhidos os mais apropriados para pesquisa dos microrganismos patogénicos mais frequentemente encontrados em cada produto biológico. Para além disso, depois de semear o inóculo nos meios adequados através da técnica de sementeira apropriada, estes devem ser incubados na estufa em condições de temperatura e atmosfera (O_2 , CO_2 , anaerobiose) ótimas para proporcionar o desenvolvimento dos microrganismos de interesse.

Existem meios de cultura não selectivos, selectivos, diferenciais, de enriquecimento, de transporte, para identificação e conservação de microrganismos. Nas tabelas 6 e 7 encontram-se resumidos os principais meios de cultura sólidos e líquidos e suas características, utilizados no departamento de microbiologia (46).

Tabela 6- Meios de cultura sólidos

Meios de cultura	Características
Gelose de sangue	<ul style="list-style-type: none"> • Columbia +5% de sangue de carneiro – meio não selectivo <ul style="list-style-type: none"> ✓ Permite o isolamento de microrganismos fastidiosos (<i>Streptococcus spp.</i>) e não fastidiosos ✓ Possui sangue de carneiro que permite uma melhor expressão de hemólise, que é um critério de base para a orientação da identificação bacteriana. • Columbia ANC+5% de sangue de carneiro – meio selectivo para Gram(+) <ul style="list-style-type: none"> ✓ A presença de ácido nalidíxico e de colimicina permite inibir a maioria das bactérias Gram (-) bem como <i>Bacillus</i>
Gelose de chocolate	<ul style="list-style-type: none"> • PolyViteX – meio não selectivo <ul style="list-style-type: none"> ✓ Permite o isolamento de bactérias fastidiosas (<i>Neisseria spp.</i>, <i>Haemophilus spp.</i>) • PolyViteX VCAT3 – meio selectivo <ul style="list-style-type: none"> ✓ Permite o isolamento de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e <i>Neisseria meningitidis</i> em amostras polimicrobianas • PolyViteX Haemophilus 2 – meio selectivo <ul style="list-style-type: none"> ✓ Permite o isolamento de <i>Haemophilus spp.</i> em amostras polimicrobianas
MacConkey	<ul style="list-style-type: none"> • Meio selectivo e diferencial; • Permite o isolamento de bactérias Gram-negativo; • Permite evidenciar a fermentação da lactose
CLED (Agar de cistina lactose deficiente em eletrólitos)	<ul style="list-style-type: none"> • Meio diferencial para isolamento e enumeração de microrganismos patogénicos na urina; • Evita a proliferação indevida (<i>swarming</i>) de espécies de <i>Proteus spp.</i> devido a ausência de electrólitos; • Permite evidenciar a fermentação da lactose
CPS	<ul style="list-style-type: none"> • Meio cromogénio, selectivo, diferencial e de identificação; • Permite o isolamento, quantificação e identificação de agentes uropatogénicos (<i>Escherichia coli</i>, <i>Proteus spp.</i>, <i>Enterococcus spp.</i> e grupo KESC (géneros <i>Klebsiella</i>, <i>Enterobacter</i>, <i>Serratia</i> e <i>Citrobacter</i>); • Contém substratos específicos das reacções enzimáticas características de cada agente, evidenciadas por cores distintas
Chapman	<ul style="list-style-type: none"> • Meio selectivo diferencial; • Permite o isolamento de <i>Staphylococcus spp.</i>; • Evidencia a fermentação do manitol
Hektoen	<ul style="list-style-type: none"> • Meio selectivo e diferencial; • Permite o isolamento de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> a partir de amostras de fezes; • Cor das colónias depende do açúcar fermentado; • Evidencia a produção de sulfato de hidrogénio (H₂S)
Gelose de Granada	<ul style="list-style-type: none"> • Meio selectivo e de identificação; • Permite o isolamento e identificação de <i>Streptococcus agalactiae</i> (principalmente em amostras de exsudados vaginais)
Campylosel	<ul style="list-style-type: none"> • Meio selectivo; • Permite o isolamento de espécies de <i>Campylobacter spp.</i> em amostras de fezes

Meio de Gardnerella (com 5% de sangue humano)	<ul style="list-style-type: none"> • Meio selectivo para Gram(+) e diferencial; • A presença de sangue humano permite evidenciar a beta-hemólise característica da <i>Gardnerella vaginalis</i>
Gelose de Sabouraud (com gentamicina e clorafenicol)	<ul style="list-style-type: none"> • Meio selectivo para isolamento de fungos(leveduras e bolores) em amostras clínicas; • A presença dos antibióticos gentamicina e clorafenicol permite inibir uma grande variedade de bactérias Gram(-) e Gram(+)
Meio de Lowenstein-Jensen	<ul style="list-style-type: none"> • Meio selectivo em tubo para isolamento de micobactérias.
Meio de Mueller-Hinton	<ul style="list-style-type: none"> • Meio não selectivo; • Permite a realização de antibiogramas pelo método de Kirby-Bauer de bactérias não fastidiosas; • Adicionado de sangue de carneiro, é utilizado para o mesmo fim mas para bactérias fastidiosas que requerem sangue para o seu crescimento(ex.: <i>Streptococcus spp.</i>)

(46)

Tabela 7- Meios de cultura líquidos

Meios de cultura	Características
Meio de Todd Hewitt	<ul style="list-style-type: none"> • Meio selectivo de enriquecimento para crescimento de <i>Streptococcus spp.</i> beta hemolíticos; • A turvação no meio é indicativa de crescimento bacteriano
Meio de Selenito	<ul style="list-style-type: none"> • Meio seletivo de enriquecimento para crescimento de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i>; • Tem propriedades que inibem os coliformes e outras espécies da flora intestinal como <i>Streptococcus spp.</i>; • A turvação no meio é indicativa de crescimento bacteriano
Hemocultura	<ul style="list-style-type: none"> • Meio não selectivo de enriquecimento; • Permite o crescimento de bactérias fastidiosas e não fastidiosas, bem como de fungos leveduriformes, em amostras de sangue

(46)

C- Procedimentos analíticos

1- Análise microbiológica

Os produtos para análise microbiológica são diversos, sendo a sua colheita, processamento laboratorial e valorização dos resultados efetuados em função do seu tipo.

1.1- Trato Respiratório Superior

A- Exsudado Faríngeo/Orofaríngeo

O exsudado orofaríngeo é, habitualmente, colhido quando há suspeita de amigdalite/ faringite bacteriana.

A.1- Colheita

A colheita deve ser realizada sob luz directa. O doente é instruído a inclinar a cabeça para trás e a sua língua é comprimida com uma espátula. A zaragatoa estéril deve ser rodada em zonas com inflamação, úlceras, vesículas ou "pontos brancos", tanto a nível das amígdalas como da faringe posterior evitando ao máximo contactar com as paredes laterais da cavidade oral, língua e úvula. A zaragatoa deve ser colocada no respetivo meio de transporte (7,47,48).

A.2 Processamento Laboratorial

A zaragatoa é, habitualmente, semeada:

- em meio de Columbia e incubado a 35 ± 2 °C, 24 a 48h;
- em meio de Todd-Hewitt com sangue 24 h e repicado para meio de Columbia ANC com incubação a 35 ± 2 °C, 24h.

Observar as placas e procurar colónias sugestivas de β -hemólise.

A.3 Valorização dos resultados

Por rotina é feita a pesquisa de *Streptococcus* β -Hemolítico dos grupos A, C e G de Lancefield, com destaque para o *Streptococcus pyogenes* (grupo A) por ser o principal agente da faringite/amigdalite bacteriana. Em casos de suspeita clínica, podem também ser pesquisados a *Neisseria gonorrhoeae* e *Corynebacterium diphtheriae* (47).

B- Exsudado Nasal

B.1 Colheita

Introdução de zaragatoa estéril ao longo do septo nasal direito e esquerdo até 2,5 cm do orifício externo (até se "sentir" uma ligeira resistência). Rodar várias vezes antes de retirar e colocar em meio de transporte adequado (7,47,48).

B.2 Processamento Laboratorial

A zaragatoa é semeada em gelose Columbia e meio de Chapman e as placas incubadas em estufa a 35 ± 2 °C durante 24 a 48h. No caso do exame cultural ser positivo, o microrganismo deve ser identificado com base no respectivo procedimento de testes de identificação e realizado o TSA.

B.3 Valorização dos resultados

A pesquisa é orientada para pesquisa de:

- *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* β-hemolítico do grupo A de Lancefield*, *Streptococcus pneumoniae** e *Moraxella catarrhalis**.

(*) Valorizar somente em casos de culturas puras ou quando a informação clínica justifica

1.2- Trato Respiratório Inferior

Na suspeita de uma infecção do tracto respiratório inferior, os produtos biológicos colhidos podem ser: expectoração, secreções brônquicas e lavado broncoalveolar. A expectoração é o principal tipo de amostra respiratória recebida no laboratório para despiste de infeções do trato respiratório inferior, pelo que será a abordada.

A- Expectoração

A.1- Colheita

Uma boa amostra de expectoração deve ser a primeira da manhã, por ser mais concentrada, e deve resultar de tosse produtiva, após lavagem da boca apenas com água, de forma a minimizar a contaminação da amostra com flora da orofaringe. As amostras devem ser enviadas ao laboratório o mais rápido possível, em recipientes esterilizados e fechados. É necessária apenas uma amostra para exame bacteriológico enquanto para pesquisa de micobactérias ou fungos são aconselháveis 3 amostras (7,47,48).

A.2- Processamento Laboratorial

➤ Exame microscópico corado:

Coloração de Gram

- Para valorização da qualidade da amostra segundo os critérios de Murray e Washington e semiquantificação de células epiteliais e leucócitos.

Tabela 8 - Critério de Murray e Washington para a valorização de amostras de expectoração, por observação a baixa ampliação (10x) (47)

	Células Epiteliais	Leucócitos
Grupo 1	25	10
Grupo 2	25	10-25
Grupo 3	25	25
Grupo 4	10-25	25
Grupo 5	<10	25

Grupos 1, 2 e 3 – amostras contaminadas por flora da orofaringe;

Grupos 4 e 5 – amostras com qualidade.

- Verificar o tipo e predomínio microbiano. Referir se for apenas observada a flora saprófita habitual. Permite também verificar as formas leveduriformes e filamentosas de fungos

Coloração de Ziehl-Nielsen

- Deve ser sempre feita para despiste de bacilos álcool ácido resistentes (BAAR)

➤ Exame cultural

Selecionar um porção da amostra com pus ou sangue e semear nos meios de cultura Columbia, MacConkey e Chocolate Haemophilus.

Incubar as 2 primeiras placas em estufa a 35 ± 2 °C até cerca de 48h. Incubar a gelose Chocolate Haemophilus em estufa de CO₂ a 35 ± 2 °C até cerca de 48h.

No caso do exame cultural ser positivo, isto é, haja desenvolvimento de bactérias patogénicas, o(s) microrganismo(s) deve(m) ser devidamente identificado(s) e realizado o TSA.

A.3 Valorização dos resultados

Na avaliação dos resultados microbiológicos da expetoração é muito importante:

- ter em conta a flora saprófita da orofaringe que ,habitualmente, contamina este tipo de amostra;
- saber quais os microrganismos habitualmente responsáveis por infecções respiratórias, diferenciar culturas puras e quantitativamente significativas, de culturas mistas resultado de contaminação ou não valorizáveis por outros factores

Os microrganismos mais frequentemente valorizados de acordo com Cumitech 7A, da American Society for Microbiology são: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Klebsiella pneumoniae* e eventualmente outros Gram negativo, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinobacter baumannii*.

B- Pesquisa de micobactérias

B.1- Colheita

Apesar de na suspeita de tuberculose, a pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* seja realizada com maior frequência em amostras respiratórias (expectoração, secreções brônquicas e lavado broncoalveolar) também pode feita no suco gástrico, urina, LCR, outros líquidos de serosas (pleural, peritoneal, pericárdico, sinovial, etc.), biópsias (gânglios linfáticos, pulmão, fígado, baço, osso, endométrio, intestino), sangue, medula e pús colhido com seringa (7,47).

Para pesquisa de *M.tuberculosis* na expetoração (mais requisitado ao laboratório) devem ser colhidas 3-5 amostras em dias sucessivos.

B.2- Processamento laboratorial

- Exame microscópico corado:

Coloração de Ziehl-Neelsen

- Para pesquisa de BAAR



Fig.40 BAAR a cor vermelha

➤ Exame cultural

Antes da sementeira, as amostras respiratórias devem ser descontaminadas com o método NaOH. Este processo de digestão e descontaminação das amostras tem como objectivo maximizar a probabilidade de detecção de micobactérias, pois as amostras encontram-se normalmente contaminadas por flora microbiana habitual de crescimento rápido. De seguida, devem ser semeadas em meio de Lowenstein-Jensen e incubadas a 37°C até um mínimo de 40 dias. Fazer leitura semanais.

As colónias de *M. tuberculosis* apresentam-se como cremes e granulares (Fig.41).



Fig.41- Colónias de *M. tuberculosis* em meio Lowenstein-Jensen

1.3 Trato Gastrointestinal

A- Coprocultura

A.1- Colheita

A colheita de fezes para coprocultura consiste na recolha de 3 amostras de dias diferentes em recipiente estéril e seco ou com meio de transporte (ex. meio Cary-Blair). É importante não encher os frascos e evitar contaminações com urina. Em recém-nascidos e em adultos debilitados, quando não é possível obter amostra de fezes, a colheita pode ser feita com o auxílio de uma zaragatoa rectal inserida até cerca de 2.5 cm acima do esfíncter anal. O transporte ao laboratório deve ser efectuado o mais rápido possível à temperatura ambiente. À medida que a amostra de fezes diminui a temperatura, o pH diminui e pode inibir muitas espécies de *Shigella* e algumas de *Salmonella* (7,47,48).

A.2- Processamento laboratorial

Retirar uma pequena porção de amostra e semear em:

- Gelose Hektoen;
- Meio líquido de Selenito;
- Gelose de Campyloset;
- Gelose Yersinia (apenas quando solicitado)
- Meio de Sabouraud (com gentamicina e cloranfenicol)- apenas quando solicitado exame micológico das fezes

Incubar as placas em estufa a 35 ± 2 °C durante 24 a 48h. O meio de Campyloset deve ser incubado em anaerobiose durante cerca de 48h na estufa a 42 ± 2 °C. O meio líquido de Selenito deve ser repicado, após cerca de 12h, para gelose Hektoen e incubado 24h em estufa a 35 ± 2 °C.

A.3- Valorização de resultados

Na avaliação dos resultados microbiológicos da coprocultura é muito importante:

- ter em conta a flora saprófita intestinal que pode contaminar este tipo de amostra;
- saber quais os microrganismos habitualmente responsáveis por infeções gastrointestinais, diferenciar culturas puras e quantitativamente significativas, de culturas mistas resultado de contaminação ou não valorizáveis por outros factores

De acordo com o Cumitech 12, da American Society for Microbiology, os microrganismos mais frequentes são:

- *Salmonella spp.*;
- *Shigella spp.*;
- *Campylobacter spp.*;
- *E. coli* enteropatogénica (EPEC, crianças);
- *Yersinia spp.* (se solicitada);
- *Candida spp.* (se solicitado o exame micológico).

1.4 Trato Urinário

A - Urocultura

As infecções do trato urinário (ITU) podem ser classificadas:

- Local da infecção:
 - Baixa, como a cistite (bexiga)
 - Alta, como a pielonefrite (parênquima renal)
- Sintomas
 - Sintomática
 - Assintomática
- Frequência
 - Episódio único
 - Recorrente
- Presença de alterações estruturais ou funcionais do trato urinário
 - não complicada(trato urinário normal)
 - complicada (presença de alteração estrutural ou funcional)

Em doentes com ITU, o quadro clínico é muitas vezes suficiente para iniciar um tratamento com antibacteriano. No entanto, o laboratório pode ser muito importante no diagnóstico e especialmente na definição do antibiótico a ser prescrito. A urocultura ou urina asséptica é o tipo de análise microbiológica mais requisitada ao Laboratório de microbiologia (47).

A.1- Colheita

A urina é um fluido biológico habitualmente estéril, mas a sua passagem através da uretra durante a micção arrasta os microrganismos que usualmente a colonizam, podendo conduzir a erros na interpretação da urocultura. Para o diagnóstico de infecção do tracto urinário são válidas várias amostras, nomeadamente obtida por jacto médio, punção de cateter urinário (algália), saco colector (bebés) e punção supra-púbica. Deve ser colhida a primeira urina da manhã. Se tal não for possível, efectuar a colheita após 2-3h sem urinar. A amostra deve ser enviada ao laboratório o mais rápido possível, uma vez que deverá ser processada até 2h após a sua colheita. Caso não seja possível, poderá ser conservada no frigorífico a 4°C durante um máximo de 24h (47,48).

O tipo de amostra que chega com mais frequência ao laboratório é a colhida por jacto médio em adultos, pelo que será descrito esse procedimento:

- Lavar as mãos com água e sabão;
- Usando uma compressa esterilizada embebida em água ou soro fisiológico estéril (nunca usar agentes antissépticos) lavar, na mulher, a vulva, da frente para trás,e, no

homem, puxar o prepúcio e lavar a glândula. Este procedimento é muito importante para evitar a contaminação da urina com a flora microbiana da uretra;

- Secar com compressas esterilizadas;
- Desprezar o primeiro jacto de urina e colher o jacto médio para o recipiente esterilizado.
- Tapar o recipiente e enviar rapidamente ao laboratório

(47,48)

A.2- Processamento laboratorial

Por norma, o procedimento laboratorial de uma urocultura contempla a análise microscópica do sedimento urinário e o exame bacteriológico directo (Gram) e cultural.

a) Exame citobacteriológico (citometria de fluxo)

No laboratório de Microbiologia do LJC existe um citómetro de fluxo (Sysmex UF-1000i (fig.23) utilizado para triagem das uroculturas. Este equipamento realiza o exame citobacteriológico da urina indicando a presença de células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, bactérias, leveduras, cilindros e cristais.

Este tipo de tecnologia apresenta sensibilidade analítica e valor preditivo negativo elevados, o que o torna ideal como procedimento de triagem, em que a máxima sensibilidade é necessária para diagnosticar amostras anormais (49,50).

As amostras sem alterações são libertadas como negativas (à excepção de crianças e grávidas) não havendo necessidade de realizar o exame microscópico e cultural; as amostras sinalizadas pelo equipamento e que apresentem as seguintes anormalidades (muitas células epiteliais tubulares, muitos leucócitos e bactérias, presença de cristais, eritrócitos e leveduras ou outras alterações consideradas relevantes) são indicadas para realização posterior da análise microscópica manual do sedimento urinário e exame cultural.

b) Exame microscópico do sedimento urinário

Para este exame, deve-se encher um tubo de centrifuga de plástico com 10 mL de urina a partir do balão inicial, centrifugar 5 ± 1 min a cerca de 1500 rpm. Decantar o sobrenadante e montar o sedimento entre a lâmina e lamela após homogeneização da amostra. Observar ao microscópio ótico com ampliação 400X, fazer a quantificação/campo de células epiteliais, leucócitos, eritrócitos e multiplicar por 5 para obter o resultado em μL . Avaliar também a presença de bactérias e leveduras e possíveis interferência com cristais ou granulações (Fig.42).

A presença de raras a algumas células epiteliais é indicativo de uma boa colheita; a leucocitúria é sinal de resposta inflamatória, podendo indicar uma possível ITU e deve ser relacionada com o resultado exame cultural.

A análise do sedimento urinário é um procedimento laboratorial de execução manual, demorado e de difícil padronização. O exame também sofre influência de vários fatores pré-analíticos e analíticos, tais como perda de elementos celulares e figurados durante a centrifugação da amostra e subjetividade de análise entre observadores, podendo levar a resultados imprecisos. A utilização da citometria de fluxo como *sreening* neste exame permite uma otimização dos processos, por eliminar a etapa de centrifugação da urina e reduzir o tempo de análise (automatização), com melhora da precisão, reprodutibilidade e padronização dos resultados (49,50).

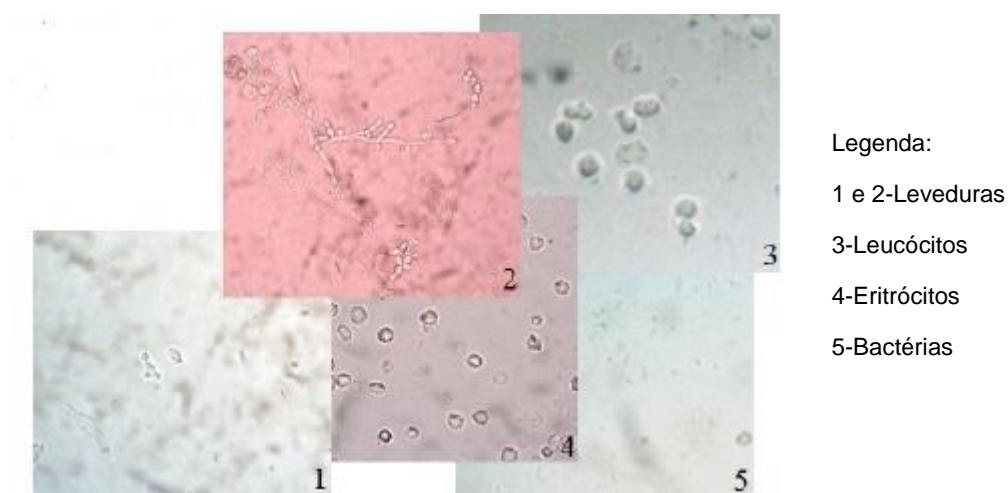


Fig.42- Elementos celulares observados a 400x no exame microscópico do sedimento urinário

c) Exame cultural

Com uma ansa descartável, semear por estria central uma porção de amostra de urina no meio de cultura de CLED. Incubar na estufa durante 18 a 48h (35 ± 2 °C).

A.3- Valorização de resultados

A valorização dos resultados culturais deve ser feita de acordo com os resultados do sedimento urinário (número de células epiteliais, leucocitúria e hematúria), contagem de colónias e informação clínica (quando disponível).

O diagnóstico laboratorial de ITU implica uma cultura pura com uma contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) $>10^5$ /mL. Em algumas situações (por exemplo crianças, uso de antimicrobianos) podem valorizar-se contagens de 10^4 ou 10^3 UFC/ml.

As ITU são, na sua maioria, causadas por um único agente e, em algumas situações, uroculturas com até dois microorganismos podem ser relevantes. Nestes casos, o sedimento urinário e a informação clínica complementar é fundamental para a valorização dos resultados culturais (51).

Os agentes etiológicos mais frequentemente envolvidos em ITU adquirida na comunidade são: *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus saprophyticus* (maior propensão para mulheres sexualmente activas), *Klebsiella spp.* e *Enterococcus faecalis*. A *E.coli* é responsável por cerca de 80% das ITU adquiridas na comunidade. Quando a ITU é adquirida em meio hospitalar, a *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* são os organismos mais frequentemente encontrados, uma vez que as suas resistências aos antibióticos favorece a sua selecção neste tipo de doentes. Também os fungos, com destaque para a *Candida spp.*, podem originar ITU (51).

1.5- Trato Genital

A- Exsudado vaginal

A.1- Colheita

No próprio dia da colheita a utente pode fazer a higiene íntima habitual apenas com água e sem uso de antissépticos.

a) Exsudado vaginal

- É recomendado o uso de espéculo;
- Introduzir uma zaragatoa esterilizada e rodar na parte mais alta da mucosa vaginal e fundos de saco posteriores;
- Colocar a zaragatoa em meio de transporte apropriado (meio de Stuart ou carvão);
- Se não for possível enviar lâmina com esfregaço, devem ser colhidas duas zaragatoas.

b) Pesquisa de *Streptococcus* do Grupo B em grávidas

- Fazer a colheita de exsudado da porção distal vaginal e em seguida, com a mesma zaragatoa fazer colheita da região anorectal;
- Colocar no meio de transporte.

c) Exsudado endocervical

Este tipo de colheita é, habitualmente, feita na pesquisa de *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma spp.* e deve ser sempre feita com auxílio do espéculo.

- Com a mulher em posição ginecológica, introduzir o espéculo;
- Antes da colheita da amostra, o colo do útero deve ser cuidadosamente limpo de todo o muco, com uma zaragatoa de algodão;
- Introduzir a zaragatoa esterilizada no endocolo (2-4 cm), rodar fazendo pressão e esperar um pouco até que a zaragatoa fique impregnada;
- Retirar a zaragatoa sem tocar nas paredes da vagina;
- Colocar e meio de transporte caso necessário

(47) (48)

A.2- Processamento laboratorial

a) Exame microscópico a fresco

Colocar um pouco de exsudado entre lâmina e lamela e observar ao microscópio ótico com ampliação de 400x. Verificar a existência de células, leucócitos, eritrócitos, parasitas (*Trichomonas vaginalis*), formas leveduriformes e filamentosas de fungos e fazer a sua semi-quantificação de acordo com:

- 0 a 5/campo— raros

- 6 a 14/campo— alguns

-> 30/campo— muitos

b) Exame microscópico corado Gram

Semi-quantificar os bacilos de Döderlein, os elementos leveduriformes, as bactérias Gram positivo e Gram negativo (com destaque para os diplococos Gram negativo intracelulares típicos da *Neisseria gonorrhoeae*), presença de “clue cells” (sugestivo de *Gardnerella vaginalis*). Indicar a presença de flora microbiana mista sem predomínio ou flora escassa.

c) Exame cultural

Semear o inóculo nos meios de: Columbia, Chocolate polyVitex VCAT3, Sabouraud (com gentamicina e cloranfenicol). Em caso de suspeita clínica pode efetuar-se também a sementeira em Gelose de *Gardnerella*. Para pesquisa de *Streptococcus* do Grupo B em grávidas é feita a sementeira em gelose de Granada.

Incubar os meios durante 24 a 48h ($35 \pm 2^{\circ}\text{C}$) em estufa e com atmosfera de CO_2 para o VCAT3 e gelose de Granada.

A.3- Valorização de resultados

O exame do exsudado vaginal serve como auxiliar ao diagnóstico das infeções genitais na mulher (vaginite e vaginose).

A vaginite consiste numa inflamação da vagina e manifesta-se pelo aparecimento de leucorreia, associado a sensação de ardor, mal-estar ou dor. Os principais microrganismos associados são: *Trichomonas vaginalis*, *Candida spp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma spp.* Os 2 últimos não são pesquisados por rotina e devem ser alvo de prescrição específica e orientada (47).

A vaginose bacteriana é caracterizada pelo aumento da produção de secreções, sem sinais clínicos de inflamação (sem leucorreia) e resulta de um desequilíbrio da flora saprófita (*Lactobacillus spp.*) com um aumento da proliferação da flora mista que inclui

Gardnella vaginalis (principal agente), *Bacteroides spp.* e *Mycoplasma spp.* (47).

Na grávida, faz parte dos exames de rotina o despiste da colonização por *Streptococcus* do grupo B, entre a 35-37 semanas de gestação, para prevenção da sépsis neonatal precoce.

B- Exsudado uretral (Homem)

B.1- Colheita

- A colheita deve ser efetuada, preferencialmente, antes da primeira urina da manhã (ou pelo menos 3 h após a última micção).
- Limpar a glândula com uma compressa embebida em soro fisiológico;
- Introduzir na uretra uma zaragatoa metálica fina e flexível ($\pm 2\text{cm}$), rodar e esperar um pouco até que a zaragatoa fique impregnada;
- Colher de preferência 2 zaragatoas, 1 para o esfregaço do exame directo e outra para o cultural;
- Introduzir no meio de transporte adequado (meio de Stuart ou meio com carvão)

(34,35)

B.2- Processamento laboratorial

a) Exame microscópico a fresco

Colocar um pouco de exsudado entre lâmina e lamela e observar ao microscópio ótico com ampliação de 400x. Verificar a existência de células, leucócitos, eritrócitos, parasitas (*Trichomonas vaginalis*), formas leveduriformes e filamentosas de fungos e fazer a sua semi-quantificação de acordo com:

- 0 a 5/campo– raros

- 6 a 14/campo– alguns

-> 15/campo– muitos

b) Exame microscópico corado Gram

Semi-quantificar a presença de bactérias Gram positivo ou Gram negativo (destaque para os diplococos Gram negativo intracelulares típicos da *Neisseria gonorrhoeae*) e as formas leveduriformes e filamentosas de fungos.

c) Exame cultural

Semear o inóculo nos meios de: Columbia, Sabouraud (com gentamicina e cloranfenicol) e Chocolate polyVitest VCAT3. Incubar os 2 primeiros em estufa ($35 \pm 2^\circ\text{C}$) e o VCAT3 com atmosfera de CO_2 , 24 a 48h.

B.3- Valorização de resultados

O exame do exsudado uretral serve como auxiliar ao diagnóstico das infecções genitais no homem. Os microrganismos pesquisados por rotina são: *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida spp.*, *Trichomonas vaginalis*. Tal como acontece no exsudado vaginal, as pesquisas de *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma spp.* devem ser alvo de prescrição específica e orientada. Quando no exame direto corado pelo Gram se observem diplococcos Gram negativo com morfologia sugestiva de *Neisseria gonorrhoeae* e não existe desenvolvimento no exame cultural, deverá ser reportado como “morfologia sugestiva de *Neisseria gonorrhoeae* no exame direto sem desenvolvimento no exame cultural”.

C- Espermocultura

C.1- Colheita

- Antes da colheita lavar o pênis com uma compressa embebida em soro fisiológico e secar com toalhete limpo;
- A colheita do esperma deve ser feita por masturbação para um frasco colector esterilizado. Na impossibilidade da colheita ser feita no laboratório, a amostra deve ser entregue até 2 horas após a recolha, conversando-a à temperatura ambiente.

(47,48)

C.2- Processamento laboratorial

a) Exame microscópico a fresco

Colocar um pouco de amostra entre lâmina e lamela e observar ao microscópio ótico com ampliação de 400x. Verificar a existência de células, leucócitos, eritrócitos, formas leveduriformes e filamentosas de fungos e fazer a sua semi-quantificação de acordo com:

- 0 a 5/campo– raros
- 6 a 14/campo– alguns
- > 15/campo– muitos

b) Exame microscópico corado Gram

Semi-quantificar a presença de bactérias Gram positivo ou Gram negativo (destaque para os diplococos Gram negativo intracelulares típicos da *Neisseria gonorrhoeae*) e as formas leveduriformes e filamentosas de fungos.

c) Exame cultural

Semear o inóculo nos meios de: Columbia, Sabouraud (com gentamicina e cloranfenicol) e Chocolate polyVitex VCAT3. Incubar os 2 primeiros em estufa ($35 \pm 2^\circ\text{C}$) e o VCAT3 com atmosfera de CO_2 , 24 a 48h.

C.3- Valorização de resultados

O exame da espermocultura serve como auxiliar ao diagnóstico das infecções do trato genital masculino no homem. Os microrganismos pesquisados por rotina são: *Neisseria gonorrhoeae*; *Enterococcus spp*; *S. aureus*; *Enterobacteriaceae*, *Candida spp*. Tal como acontece no exsudado uretral, as pesquisas de *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma spp*. devem ser alvo de prescrição específica e orientada

1.6- Olho

A- Exsudado ocular

A.1- Colheita

- Limpar a pele à volta do globo ocular com soro fisiológico, utilizando uma compressa esterilizada;
- Deve ser colhida uma zaragatoa para cada olho, mesmo que só um apresente sinais de inflamação;
- Colher o exsudado do fundo do saco conjuntival e fórnix de cada olho, no sentido do osso temporal para o osso lacrimal;
- Evitar contaminações com o bordo palpebral e pestanas;
- Enviar as zaragatoas em meio de transporte apropriado ao laboratório.

(47,48)

A.2- Processamento laboratorial

a) Exame microscópico corado Gram

Semi-quantificar a presença de bactérias Gram positivo ou Gram negativo e as formas leveduriformes e filamentosas de fungos.

b) Exame cultural

Semear o inóculo nos meios de: Columbia, MacConkey, gelose de Chapman, Saboraud, Chocolate Haemophilus e Chocolate poyvitex VCTA3. Incubar os 4 primeiros em estufa ($35 \pm 2^\circ\text{C}$) e os 2 últimos com atmosfera de CO_2 , durante 24 a 48h.

A.3- Valorização de resultados

Os agentes etiológicos mais comuns são *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. A conjuntivite aguda pode resultar ainda de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, quer em indivíduos sexualmente activos, quer em recém-nascidos (47).

1.7 Ouvido

A- Exsudado auricular

A.1- Colheita

- Limpar com gaze o meato externo auricular;
- Introduzir uma zaragatoa estéril no canal auditivo externo e com um movimento suave de rotação, colher o exsudado;
- Introduzir a zaragatoa em meio de transporte adequado (47,48)

A.2- Processamento laboratorial

a) Exame microscópico corado Gram

Semi-quantificar a presença de bactérias Gram positivo ou Gram negativo e as formas leveduriformes e filamentosas de fungos.

b) Exame cultural

Semear o inóculo nos meios de: Columbia, MacConkey, gelose de Chapman, Saboraud, Chocolate Haemophilus. Incubar os 3 primeiros em estufa ($35 \pm 2^\circ\text{C}$) e o último com atmosfera de CO_2 , durante 24 a 48h.

A.3- Valorização de resultados

As culturas do canal auditivo externo, geralmente, não refletem a causa microbiana da otite média, a não ser que a membrana do tímpano estivesse recentemente rompida. Em certas ocasiões, a cultura de exsudado posterior da faringe pode revelar os microrganismos causadores da otite média (47).

Com base no Cumitech da American Society for Microbiology os microrganismos mais frequentes no exsudado auricular são:

- *Haemophilus influenzae*;
- *Streptococcus pneumoniae*;
- *Streptococcus β -hemolíticos(+raro)*;
- *Moraxella catarrhalis*;
- *Pseudomonas aeruginosa* (mais comum em frequentadores de piscinas)
- *Aspergillus niger*

1.8 Feridas

A- Exsudado purulento

A.1- Colheita

Se houver exsudado, puncionar com seringa e agulha e enviar em tubo seco esterilizado ou meio de transporte adequado. Caso não seja possível aspirar o exsudado, colher o mais profundamente possível da ferida o mais afastado dos bordos com zaragatoa e enviar em meio de transporte.

O produto obtido com zaragatoa tem menos qualidade do que o produto colhido através de punção, pois está mais sujeito a contaminação e é de difícil observação(47,48)..

A.2- Processamento laboratorial

a) Exame microscópico corado Gram

Semi-quantificar a presença de bactérias Gram positivo ou Gram negativo.

b) Exame cultural

Semear o inóculo nos meios de: Columbia, MacConkey, gelose de Chapman e Todd Hewitt (com posterior repicagem, ao fim de 24h, para meio de Columbia ANC). Incubar em estufa ($35 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 24 a 48h.

A.3- Valorização de resultados

Os microrganismos mais frequentes nos exsudados purulentos são:

- *Enterobacteriaceas*,
- *Pseudomonas spp.*,
- *Staphylococcus aureus*,
- *Streptococcus pyogenes*,

As bactérias anaeróbias também podem ser agentes de infecções de feridas, principalmente nas internas. A sua pesquisa deve ser alvo de prescrição específica e orientada (47).

1.9 Sangue

A- Hemocultura

A.1- Colheita

As colheitas devem ser realizadas antes de iniciar a antibioterapia. Se esta já estiver em curso, efectuar a colheita antes da toma seguinte; o ideal é obter a amostra antes de um pico febril. Existem garrafas de hemocultura distintas para pesquisa de microrganismos aeróbios e anaeróbios.

- Higienizar as mãos antes de proceder à colheita, quer se usem luvas ou não;
- Desinfetar o local da punção com álcool a 70% de modo circular e do interior para a periferia e deixar secar;
- Repetir a operação com solução alcoólica iodada e deixar secar;

IMPORTANTE - Não palpar a veia após a desinfecção da pele e antes de inserir a agulha, se isto acontecer repetir todo o processo de desinfecção.

- Desinfetar a tampa de borracha do frasco de hemocultura com álcool a 70° e deixar secar durante 1 minuto;
- É recomendada a colheita de no mínimo 2 frascos para hemocultura;
- Inocular o volume de sangue adequado consoante a proporção indicada na garrafa. Nas garrafas para o BacT/ALERT (Fig.35), deve ser introduzido 8-10 mL de sangue (adultos) e 5-10 mL (crianças);
- Após a colheita, remover o iodo da pele com álcool a 70% de modo a prevenir reações adversas ao iodo;
- Nunca refrigerar as hemoculturas após a colheita. Enviar de imediato ao Laboratório de Microbiologia, pois devem ser incubados rapidamente. Se tal não for possível, conservar o(s) frasco(s) a 37°C ou à temperatura ambiente até serem enviados ao laboratório.

Devem fazer-se um mínimo de 3 hemoculturas em 24 horas, colhidas separadamente, sendo o intervalo entre as colheitas variável conforme a situação do doente ou a urgência do início de administração de antibióticos. A colheita de uma única hemocultura é fortemente desaconselhada e pode levar a que uma bacteriemia intermitente não seja detetada, assim como pode dificultar a interpretação do significado clínico de certos microrganismos isolados (47,48).

A.2- Processamento laboratorial

As hemoculturas consideradas positivas pelo Sistema BacT/ALERT seguem o seguinte processamento laboratorial.

a) Exame microscópico corado Gram

Verificar a presença e a morfologia de bactérias Gram positivo e Gram negativo.

b) Exame cultural

No caso de ser uma hemocultura em aerobiose, semear o inóculo em gelose de Columbia e incubar 24h a 35 ± 2 °C.

Para as hemoculturas em anaerobiose semear o inóculo em meio de Columbia e Schaedler e incubar as placas em atmosfera de anaerobiose. Incubar 48 a 72h na estufa a 35 ± 2 °C. Neste caso deve ser sempre comparado com um frasco colhido em aerobiose ou se não existe, fazer paralelamente uma sementeira em aerobiose, em gelose Columbia para o controlo de anaerobiose.

A.3- Valorização de resultados

A hemocultura serve para auxiliar o diagnóstico de infeções sistémicas. É importante e de todo o interesse conhecer alguma infeção simultânea à bacteriémia, pois esta poderá ser secundária, facilitando a identificação e a caracterização do microrganismo subjacente, inclusive permitindo a escolha de meios de cultura mais específicos. São exemplos, a pielonefrite provocada por *Escherichia coli* e a meningite provocada por *Neisseria meningitidis* (47).

Os microrganismos mais frequentemente isolados em hemoculturas positivas são:

- *Staphylococcus aureus*;
- *Enterobacteriaceae*,
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Enterococcus*
- *Candida albicans*

É fundamental e de grande importância clínica diferenciar hemoculturas verdadeiramente positivas das contaminadas. Quando são isolados microrganismos, tais como, *Streptococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans* e outros *Staphylococcus* coagulase negativa é necessário ter particular atenção sobre potenciais contaminações.

Na dúvida deve-se avaliar:

- o número de hemoculturas positivas:
 - ✓ *uma hemocultura* - o crescimento deve ser valorizado em conjunto com os dados clínicos ;
 - ✓ *mais de uma hemocultura*:
- as culturas devem estar puras;
- duas delas devem apresentar crescimento do mesmo microrganismo;
- só uma cultura positiva aponta para uma provável contaminação.
 - Características biológicas das estirpes isoladas;
 - Fonte da cultura (punção venosa ou cateter)

As sépsis a anaeróbios são situações clínicas muito pouco frequentes. A positividade dos frascos de hemocultura em anaerobiose são na maior parte dos casos da responsabilidade de bactérias anaeróbias facultativas, como por exemplo *Staphylococcus spp.* (47).

1.10 Fungos

A- Exame micológico

A.1- Colheita

Os fungos patogénicos mais comuns em doenças infecciosas da pele, cabelo e unhas são os dermatófitos. Estes fungos possuem predileção por locais quentes e húmidos (virilha, axilas, região interdigital) e geralmente as micoses causadas por estes fungos são auto-limitadas(47,48).

Normalmente o tipo de amostras para pesquisa de dermatófitos são:

- Restos de unhas (obtidas por raspagem, corte ou com zaragatoa);
- Pêlos (colheita com pinça esterilizada)
- Pele (raspagem do couro cabeludo ou de lesões cutâneas não ulceradas)

A pesquisa de outro tipo de fungos leveduriformes e filamentosos pode ser solicitado em amostras clínicas mais comuns como: secreções de mucosa (oral, vaginal, anal, ocular), amostras respiratórias, urina, sangue, fezes, entre outras (34,35).

A.2 Processamento laboratorial

a) Exame microscópico directo

a.1 Amostras de pele, cabelo e unhas

- Sobre uma lâmina colocar 2 gotas de solução de hidróxido de potássio (KOH) a 40% e um pouco de material colhido;
- Cobrir com uma lamela e deixar a repousar por 2h em câmara húmida;
- Observar ao microscópio com objectiva de 40X, procurando estruturas filamentosas septadas ou não.

a.2 Exsudados, amostras respiratórias, urina, fezes e outros

- Através do exame a fresco e corado por Gram, semi-quantificar as formas leveduriformes e filamentosas de fungos.

b) Exame cultural

b.1 Amostras de pele, cabelo e unhas

Semear a amostra em meio de Sabouraud. Incubar a 35 ± 2 °C até 7 dias e se necessário mais 7 dias à temperatura ambiente.

b.2 Exsudados, expectoração, urina, fezes e outros

Semear a amostra em meio de Sabouraud. Incubar a 35 ± 2 °C 24 a 48h. Na pesquisa de *Aspergillus spp.* prolongar a incubação mais 24 a 48h a temperatura ambiente.

A.3- Valorização de resultados

Os resultados obtidos diferem em consonância com o tipo de produto. No caso de amostras de pêlo, cabelo e pele é de valorizar a presença de Dermatófitos e nalguns casos *Candida spp.* Para o outro tipo de amostras clínicas, deve valorizar-se a presença de fungos leveduriformes como a *Candida spp.* (principalmente no exsudado vaginal) e/ou filamentosos, como o *Aspergillus spp.* (principalmente no exsudado auricular e amostras respiratórias).

D- Testes de identificação e suscetibilidade a agentes microbianos

A tabela 9 resume os principais testes de identificação microbiológica.

Tabela 9- Principais testes utilizados para identificação microbiológica

Teste	Utilidade
Coloração de Gram	<ul style="list-style-type: none"> • Permite distinguir os 2 principais grupos de bactérias: Gram negativa (coloração rosa) e Gram positiva (coloração roxa); • Permite avaliar as características morfológicas das bactérias (cocos, diplococos, bacilos); • Serve de diagnóstico presuntivo do agente infeccioso e para orientar na sua identificação definitiva • Serve também para avaliar a qualidade das amostra, observar leucócitos, formas parasitárias e fungos
Catalase	<ul style="list-style-type: none"> • Permite distinguir microrganismos catalase positivos (<i>Staphylococcus spp.</i>) dos catalase negativa (<i>Streptococcus spp.</i>) • A catálase degrada o H₂O₂ produzindo efervescência.
Slidex Staph Plus	<ul style="list-style-type: none"> • Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> • O reagente engloba partículas de látex sensibilizadas com Acs monoclonais para as estruturas do <i>S.aureus</i>
Oxidase	<ul style="list-style-type: none"> • Para diferenciar <i>Pseudomonas spp.</i> (oxidase positiva) das <i>Enterobacteriaceae</i> (oxidase negativa). As <i>Neisseria spp.</i> são também oxidase positiva.
Bacitracina	<ul style="list-style-type: none"> • Diferenciar <i>Streptococcus</i> β-hemolítico do grupo A de Lancefield (geralmente sensíveis a pequenas quantidades de Bacitracina) de outros <i>Streptococcus</i> β-hemolíticos (geralmente resistentes)
Optoquina	<ul style="list-style-type: none"> • Distingue o <i>Streptococcus pneumoniae</i> (geralmente sensível) de outros <i>Streptococcus</i> alfa-hemolíticos (resistentes)
Slidex Strepto Plus	<ul style="list-style-type: none"> • Identificação de <i>Streptococcus</i> β-hemolíticos do grupo A, B, C, D, F, G, através dos seus Ags específicos
Soro Anti- <i>E.coli</i> Enteropatogênica	<ul style="list-style-type: none"> • Soro aglutinante para identificação de <i>E.coli</i> Enteropatogênica
Soro Anti- <i>Salmonella Spp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Confirmação serológica da <i>Salmonella spp.</i>; • Soro polivalente para as aglutininas somáticas e o Ag capsular da <i>Salmonella spp.</i>

<p>Cartas de identificação em sistema automatizado (VITEK 2)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Cartas GP para identificação da maioria dos cocos Gram positivo com interesse clínico; • Cartas GN para identificação da maioria dos bacilos Gram negativo fermentadores e não fermentadores; • Cartas ID-YST para identificação da maior parte dos fungos com significado clínico; • Carta IDNH para identificação de <i>Neisseria spp.</i>, <i>Haemophilus spp.</i>, <i>Campylobacter spp.</i> e <i>Gardnerella vaginalis</i> • Carta para identificação de bactérias anaeróbias
--	--

O teste de suscetibilidade a agentes antimicrobianos (TSA) aplica-se às análises microbiológicas de produtos biológicos que revelem desenvolvimento de microrganismos patogénicos.

Pode ser executado em sistemas automatizados (ex. VITEK 2) baseados na concentração inibitória mínima (CIM), galerias (microdiluição) ou em placa pelo método de difusão Kirby-Bauer. É muito importante que seja realizado com colónias em cultura pura.

O TSA em placa é considerado o método de referência e é o de primeira linha para *Neisseria spp.* e *Streptococcus* β -hemolítico. É usado como método confirmatório no caso de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.* e outros Gram negativo não fermentadores, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.* e *Haemophilus spp.* Os antibióticos devem ser testados e reportados de acordo com as *guidelines* europeias do European Committee on Antimicrobial(EUCAST) ou as recomendações do CLSI.

E- Pesquisa de Beta-lactamases de largo espectro (BLSE)

As bactérias multirresistentes aos antibióticos habituais tornaram-se num problema de saúde pública mundial. Um dos mecanismos de resistência das *Enterobacteriaceae* é a produção de BLSE, que são enzimas capazes de hidrolisar vários antibióticos beta lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas (também de 3ª e 4ª gerações) e monobactams (aztreonam) inibindo a sua ação. As bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são agentes etiológicos habituais de infeções comunitárias e nosocomiais e são as principais *Enterobacteriaceae* capazes de produzir estas enzimas, embora já tenha sido detetada a produção de BLSE em outras bactérias pertencentes à família (47).

Um dos métodos mais clássicos de detecção fenotípica de BLSE é o teste de sinergismo, no qual são colocados discos de ceftriaxone, aztreonam, cefotaxime e ceftazidime a 15-20mm do disco de amoxicilina/ácido clavulânico (AMC). A atividade das BLSE é significativamente inibida na presença de inibidores de beta-lactamases, nomeadamente o ácido clavulânico. O aumento da zona de inibição entre o disco de AMC e os restantes –sinergismo, é indicativo da produção de BLSE (Fig.43).

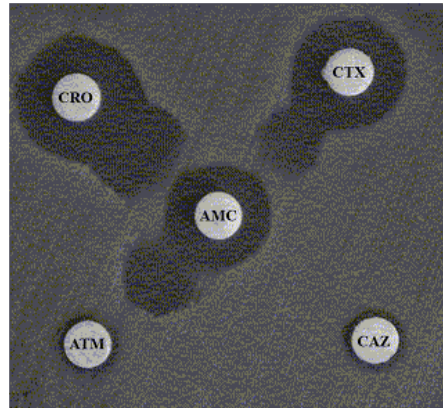


Fig.43- Teste em placa para pesquisa de BLSE

F- Pesquisa de ovos, quistos e parasitas (Técnica da concentração pelo Formol Etil-Acetato)

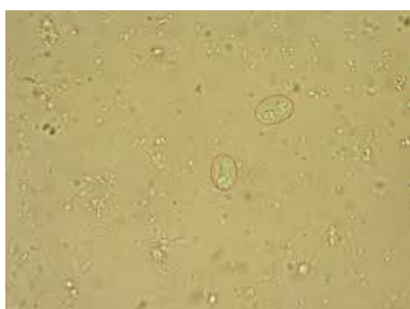
1- Fundamento

A técnica de concentração pelo Formol Etil-Acetato baseia-se na diferença de solubilidade dos diferentes componentes das fezes. O meio A (solução de formaldeído) simultaneamente conserva os parasitas e solubiliza os componentes hidrófilos; o meio B (solução de acetato de etilo) solubiliza os componentes lipófilos como as gorduras; o meio C (solução de iodo) cora diferencialmente as estruturas. Estes meios, quando misturados, criam uma suspensão imiscível que após filtração é centrifugada e exhibe 3 camadas distintas: uma superficial de componentes lipófilos, uma intermédia formada por detritos de densidade intermédia, uma camada profunda composta por elementos hidrófilos e no fundo do tubo um sedimento de compostos de alta densidade que inclui os ovos, os quistos e as larvas de parasitas.

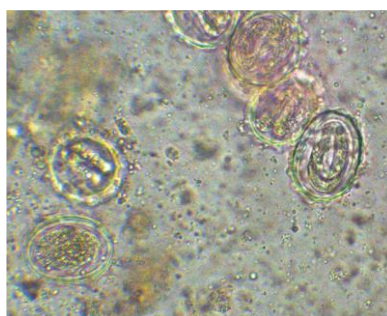
2- Valorização de resultados

O exame parasitológico é considerado negativo quando não se observam estruturas parasitárias. A observação de ovos, quistos ou larvas, mesmo que seja um único elemento é suficiente para considerar o exame positivo. Na tabela 10 estão exemplificados alguns parasitas e a suas formas (ovos, quistos e larvas) que aparecem em laboratório.

Tabela 10- Alguns exemplos de parasitas e suas formas (ovos, quistos e larvas)



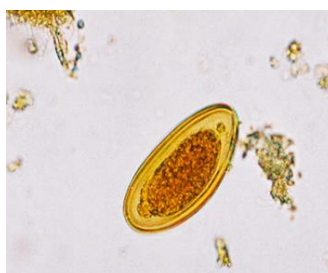
Quistos de *Giardia intestinalis*(400X)



Ovos de *Ascaris lumbricoides*(400X)



Larva de *Ascaris lumbricoides*(400x)



Ovo de *Enterobius vermicularis* (400X)



Ovo de *Hymenolepis nana* (400X)



Ovo de *Enterobius vermicularis* (400X)

G- Casos Laboratoriais

Caso 11

Informação Clínica: Mulher de 30 anos com ardor a urinar e dor lombar dirige-se ao laboratório para realizar uma urocultura.

Resultados Laboratoriais:

Urocultura

Exame directo:

Fresco (Sedimento urinário): Observação de raras células epiteliais e abundantes leucócitos

Gram: Bacilos Gram negativo

Exame cultural:

Crescimento de colónias grandes e amarelas (fermentadoras da lactose) no meio de Cled, sugestivas de *Escherichia coli*. Foi contabilizado um número de colónias correspondente $>10^5$ UFC / ml.

Valorização:

A valorização dos resultados culturais deve ser feita de acordo com os resultados do sedimento urinário, microrganismo isolado, contagem de colónias e informação clínica (quando disponível).

De um modo geral, uma cultura de urina é considerada positiva quando é identificada a presença de uma única espécie bacteriana em quantidade $> 10^5$ UFC/mL. Um número elevado de leucócitos na urina (piúria) está presente na maioria dos doentes com quadros de ITU, no entanto, alguns doentes com bacteriúria, a contagem de leucócitos pode se apresentar normal (51).

Neste caso a contagem de um número de microrganismos $> 10^5$ UFC/ em cultura pura, associado a sintomatologia de ITU e uma observação abundante de leucócitos no exame a fresco confirma o diagnóstico laboratorial de infecção urinária.

Identificação

A carta GNI do Vitek (para identificação de Gram negativo) identificou o microrganismo como sendo uma *Escherichia Coli*.

Concluimos portanto que a doente, possui uma infecção urinária por *Escherichia Coli*. Esta bactéria pertence à família das *Enterobacteriaceae* e é a principal responsável por ITU não complicada. Embora faça parte da microbiota intestinal pode atingir o tracto urinário por via ascendente, por contaminação fecal da uretra, até á bexiga e por vezes até ao rim originando infecção. (51).

Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

Foi testada uma carta do Vitek com vários antibióticos tendo todos revelado sensibilidade. Apesar das várias sensibilidades só devem ser reportados os resultados dos antibióticos mais apropriados em função do tipo de microrganismo isolado, tipo de produto e situação clínica (quando conhecida), de acordo com as recomendações das *guidelines* europeias (European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing (EUCAST)).

Caso 12

Informação Clínica: Homem de 69 anos, fumador. Foi ao médico porque nas últimas semanas tem tido tosse produtiva. Referiu que sofre de doença pulmonar crónica obstrutiva. Foi solicitada a análise microbiológica da expectoração.

Resultados Laboratoriais:

Exame directo:

Gram: Algumas células. Muitos leucócitos. Bacilos Gram negativo

Ziehl-Nielsen: Negativo para BAAR

Exame cultural:

Crescimento de colónias grandes, vermelhas (fermentadoras da lactose) e mucóides no meio de MacConkey sugestivas de *Klebisella spp.*

Valorização:

A *Klebisella spp.* é um dos microrganismos patogénicos a considerar no exame cultural de expectoração.

Identificação

A carta GNI do Vitek (para identificação de Gram negativo) identificou o microrganismo como sendo uma *Klebsiella pneumoniae*.

A *K.pneumoniae* é considerada um microrganismo patogénico oportunista. As principais infeções (ITU e pneumonia) podem ser adquiridas na comunidade mas são mais frequentes em ambiente hospitalar. O facto de esta bactéria poder colonizar a orofaringe faz com que seja fonte de infeções pulmonares que geralmente ocorrem em doentes com condições debilitantes (ex. doença pulmonar crónica obstrutiva), como é o caso.

Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

Foi testada uma carta do Vitek com vários antibióticos tendo todos revelado sensibilidade à exceção da ampicilina, o que é normal porque esta bactéria apresenta resistência intrínseca à mesma. Ter em atenção que algumas estirpes de *Klebsiella* têm capacidade de produzir beta-lactamases de largo espectro.

4- CONTROLO DE QUALIDADE

O Controlo de Qualidade (CQ) consiste no conjunto de procedimentos e medidas adotadas na rotina laboratorial cujos principais objetivos são:

- Garantir a consistência, reprodutibilidade e fiabilidade dos resultados obtidos;
- Detecção de anomalias, avaliação de possíveis erros analíticos e sua correção;
- Prevenção de possíveis erros analíticos antes que os resultados comecem a sofrer variações clinicamente significativas e sobretudo que tenham repercussões negativas nas decisões médicas

(52)

Para atingir estes objetivos é necessário implementar um bom Sistema de Controlo de Qualidade que deve englobar as fases pré-analítica, analítica e pós-analítica dos exames laboratoriais. Centremo-nos no Controlo de Qualidade Analítico (CQA) visto ser o mais implementado nos laboratórios clínicos como ferramenta para validar os processos analíticos que originam os resultados.

O CQA contempla 2 tipos de CQ.:

- *Controlo de Qualidade Interno*
- *Avaliação Externa da Qualidade*

Controlo de Qualidade Interno (CQI)

Consiste no uso diário de materiais de CQ (“controles”), ou seja, amostras com características conhecidas (concentrações analíticas pré-determinadas, presença de determinados Ag e Acs, etc) inseridas no processo analítico como se fossem amostras de doentes (53).

Os controlos devem ser processados:

- antes da análise das amostras dos doentes para determinar se o sistema analítico está a operar bem;
- de acordo com as características dos ensaios ou dos sistemas analíticos.;
- após qualquer procedimento de calibração;
- após troca de lote de reagente;
- após procedimento de manutenção, preventivo ou reparação relevantes do sistema analítico;
- sempre que haja necessidade de monitorizar a estabilidade do funcionamento do ensaio/sistema analítico durante a série analítica (intervalo tempo máximo 24h) no decurso do trabalho

Para cada parâmetro analítico, devem ser estabelecidos limites de controlo (LC), regras de CQ e aplicar os limites de especificação analítica (LEA) garantindo assim a utilização racional e eficaz dos procedimentos de controlo (52).

No laboratório de Microbiologia, o CQI é diferente e são implementados um conjunto de procedimentos mais específicos, como por exemplo, utilização de estirpes padrão (ATCC) para testar os meios de cultura, as cartas de identificação e de antibiograma, monitorização de temperaturas das estufas, entre outros.

Limites de controlo

Os LC correspondem ao intervalo de aceitação para monitorizar a estabilidade do desempenho dos sistemas analíticos e avaliar a existência de uma condição de erro, cuja causa necessita de ser identificada e corrigida. Estes limites são usualmente calculados através da média e desvio padrão. É recomendado que se use os LC do fabricante apenas para os primeiros 5 pontos do CQI de um determinado parâmetro. A partir daí, deve-se utilizar a média e o desvio padrão obtidos até então para os intervalos de aceitação, e a partir dos 20 pontos considera-se a média e o desvio padrão obtido, desde que os intervalos estejam contidos dentro dos LC do fabricante (52).

Regras de Controlo de Qualidade

Os valores de CQI obtidos diariamente devem ser registados em Cartas de Levey Jennings (Fig.44) que devem estar avaliadas por regras de CQI (regras de “Westgard”).

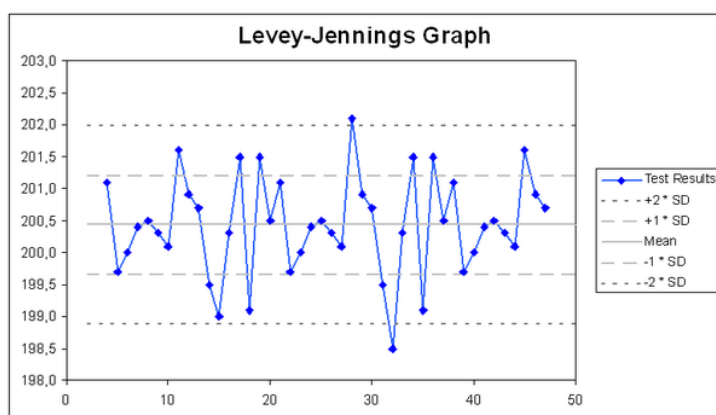


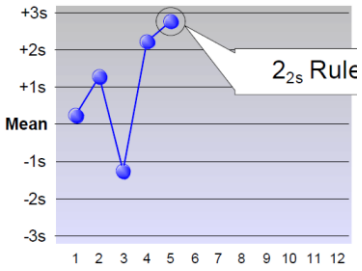
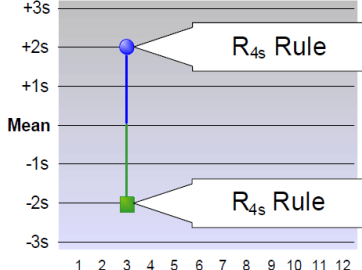
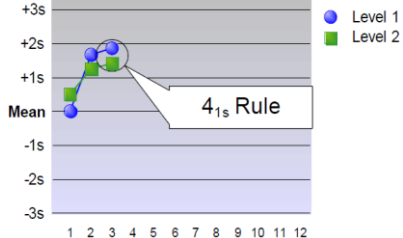
Fig.44- Cartas de Levey Jennings

As regras de CQI são a base de decisão sobre se um processo analítico está dentro ou fora de controlo, que tipo de erro está a ocorrer assim como a sua magnitude. Devem ser aplicadas de modo a permitir detetar, quer os erros sistemáticos (clínica e laboratorialmente mais importantes), quer os fortuitos (53).

Na tabela 11 estão resumidas as principais regras de CQ e sua utilidade em Laboratório.

Tabela 11- Principais regras de CQ e sua utilidade em laboratório

Regra de Westard	Utilidade
	<ul style="list-style-type: none"> • Regra de alerta; • Detecta erros sistemáticos e aleatórios
	<ul style="list-style-type: none"> • Regra de rejeição • Deteta erros aleatórios

	<ul style="list-style-type: none"> • Regra de rejeição. • Detecta apenas erros sistemáticos • Aplica-se a 1 ou 2 níveis de controlo
	<ul style="list-style-type: none"> • Regra de rejeição. • Detecta apenas erros aleatórios • Aplica-se apenas Intra-Série.
	<ul style="list-style-type: none"> • Regra de aviso • Detecta apenas erros sistemáticos

Em suma, as regras que permitem detetar erros sistemáticos e aleatórios são:

- Erros sistemáticos: Regra 2_{2SD} ; Regra 4_{1SD} ; Regra N_x
- Erros aleatórios: Regra 1_{3SD} ; Regra R_{4SD}

Estas regras podem ser **simples** (usadas isoladamente) ou **múltiplas** (usadas em simultâneo). As avaliações de CQI com base nas regras múltiplas trazem alguns benefícios como análise simples através de gráficos, possibilidade de ação imediata, fácil integração e adaptação à rotina, baixo nível de falsas rejeições ou falsos alarmes e melhor capacidade de identificação de erros e indicação do tipo de erro (Fig. 45) (52).

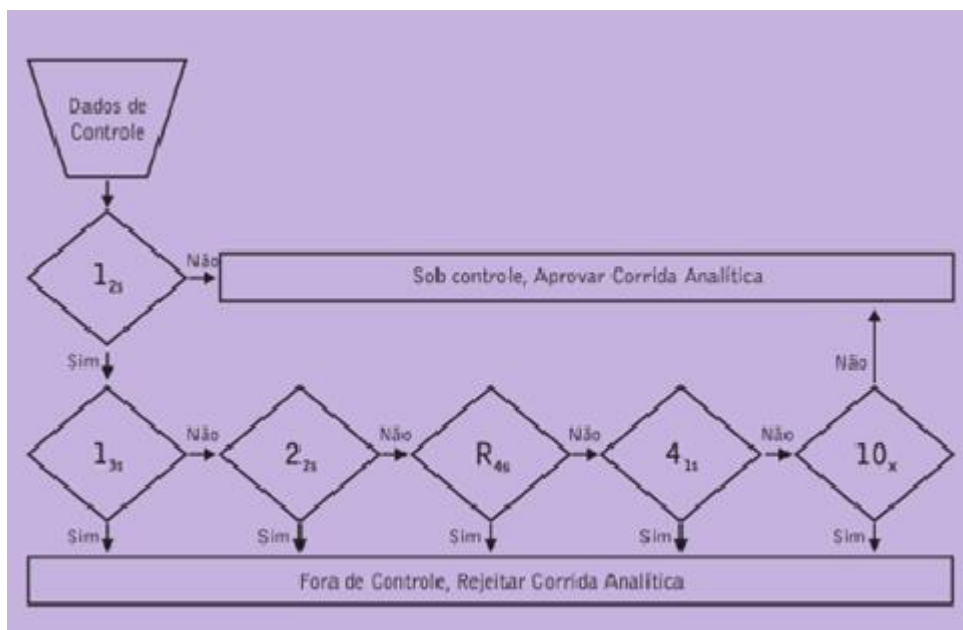


Fig.45- Diagrama para aprovação da série analítica com base nas regras múltiplas de Westgard

As cartas de controlo mostram se um processo está ou não sob controlo estatístico, porém é necessário também saber se o processo tem capacidade de produzir resultados analíticos de acordo com os LEA estabelecidos para os diferentes parâmetros.

Limites de especificação analítica

O propósito principal do CQI é minimizar os erros associados ao desempenho do sistema analítico. Para isso deve-se definir a qualidade desejada – LEA para cada parâmetro analítico de forma a assegurar decisões clínicas adequadas.

Os LEA são definidos sob a forma de erro total máximo admissível (ETa)- variação máxima aceitável para um determinado resultado laboratorial, gerada a partir dos efeitos combinados dos erros aleatórios (precisão) e sistemáticos (exatidão). São definidos externamente com o objetivo de determinar o risco de serem reportados resultados analíticos com um erro considerado inaceitável (ex. : Erro total calculado (ETc) >ETa).

Quando os valores de CQI ultrapassam o intervalo definido por estes limites implica a rejeição da série analítica e que os resultados dos doentes sejam reanalisados (54).

Avaliação do CQI

Quando os resultados de CQI diário estão dentro dos LC adotados e não é violada nenhuma regra de Westgard, assume-se que o sistema analítico está a funcionar adequadamente e os resultados da série analítica são considerados fiáveis. Caso contrário, deve-se averiguar a presença de algum problema, identificar a causa e corrigi-lo. Deve-se registar as falhas, comentários e ações tomadas.

A avaliação da qualidade de desempenho analítico mensal dos ensaios pode ser efetuada através dos seguintes indicadores e critérios, com base nos valores acumulados mensalmente (valor mínimo de $N > 6$ e ideal > 20).

- $ET_c = 1,96 \times SD(CV\%)$ observado $< ET_a$ adoptado
- ICV - Índice de coeficiente de variação = $CV \% \text{ observado} / CV \% \text{ do próprio método}$
 $< 2,0$

Nota: O ICV é uma medida de dispersão dos resultados face ao erro máximo admissível ou critério de aceitação. É também uma medida de desempenho deste controlo face ao significado biológico da sua variação. Quanto mais baixo for este valor (mais próximo de zero), melhor é o desempenho do controlo.

(54)

Avaliação Externa da Qualidade (AEQ)

O processo de AEQ assenta em programas de CQ nacionais ou internacionais que podem ser organizados por instituições profissionais especializadas (exemplo: PNAEQ-INSa e UK-NEQAS), pelos fabricantes de materiais de controlo (ex.: Biorad- comparação interlaboratorial informatizada, disponibilizada no programa Unity Real Time) ou por entidades reguladoras. Cada programa avalia diferentes parâmetros em periodicidades distintas.

O objectivo é avaliar se a qualidade dos resultados reportados é adequada para a prestação de cuidados de saúde, em função dos padrões adoptados e permitir monitorizar e comparar, ao longo do tempo, o desempenho analítico dos diferentes laboratórios participantes e dos sistemas analíticos comercializados

O ET_a deve ser o principal indicador de desempenho como critério de aceitabilidade para os métodos quantitativos, podendo ser associado ou não ao critério estatístico (Índice de desvio(ID)). Para os métodos qualitativos é avaliada a concordância dos resultados obtidos e os valores ou intervalos esperados e/ou referenciados como corretos para as amostras enviadas (52).

É muito importante que os laboratórios definam critérios internos de avaliação de falhas face aos resultados de AEQ. Um exemplo é:

- o BIAS do parâmetro analítico deve ser $< ET_a$ adoptado- critério único.
- Se $BIAS > ET$ associado a um $ID > 2,0$ ($p < 0,05$) ou $> 3,0$ ($p < 0,01$) e o número mínimo de laboratório for de 10 (ideal $>$ ou igual 20)--, considera-se que existe uma falha do laboratório ou um desvio com amplitude significativa em relação aos padrões de qualidade adoptados.

(54)

5-CONCLUSÃO

A realização deste estágio possibilitou uma excelente integração dos conhecimentos teórico-práticos adquiridos ao longo do mestrado em análises clínicas, bem como a aquisição de novos saberes numa área tão vasta como a laboratorial.

Tendo em conta o meu processo de especialização em análises clínicas pelo Ordem dos Farmacêuticos, a realização do estágio num Laboratório com a dimensão e qualidade do LJC foi altamente enriquecedor a nível técnico-científico e pessoal, na medida em que me permitiu aprofundar, melhorar e elevar a um nível superior as minhas competências laboratoriais.

De referir, que muito existiria para discutir sobre a frequência deste estágio, porém devido às regras impostas para a apresentação da monografia, limitei-me a focar os principais procedimentos e exames laboratoriais das principais valências Hematologia, Química Clínica, Endocrinologia-Imunologia e Microbiologia.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barro E, Albuquerque GC, Xavier, RM, et al. Laboratório- Na prática clínica. 2ªEd. Brasil. Artmed, 2010.
2. Erichsen ES, Faria RMD, Santos SME, et al. Medicina Laboratorial para o Clínico. 1ªEd. COOPMED, 2009.
3. McPherson RA e Pincus MR. Henry 's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods' B Saunders Company, 2012.
4. Castro CF, Jiménez LR, Ginés MAR, et al. El Laboratorio Clínico y la Función hormonal. LABCAM (Asociación Castellano-Manchega de Análisis Clínicos), 2011.
5. Burtis C, Ashwood E, Bruns DE. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 7ª Edition. Elsevier/Saunders, 2014.
6. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. Recomendações para Coleta e preparo da amostra biológica Manole, 2014.
7. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). Orientações para a elaboração de um Manual de Boas Práticas em Bacteriologia. 2004.
8. Laboratório Dr. Joaquim Chaves [Internet]. [Citado a 21 de outubro de 2016]; Disponível em: http://www.jcs.pt/dev2/pt/analises_clinicas/saber_mais.
9. Norma da Direção-Geral da Saúde Nº. 063/2011 de 30/12/2011 – Prescrição e determinação do hemograma. Direção-Geral da Saúde [Internet]. 2014. [Citado em 15 de Março de 2015. Disponível em: <http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas>.
10. Hoffbrand, AV e Moss PAH. Hoffbrand's Essential Haematology. Wiley-Blackwell, 2015.
11. ADVIA® 2120/2120i Hematology Systems – Guia do Operador,. s.l. : Siemens Healthcare Diagnostics, 2010.
12. Bain BJ, Bates I, Laffan MA, et al. Dacie and Lewis practical haematology. 11th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2012.
13. Ves-Matic Cube 200 – Manual Operativo, Revisão 2.01, Diesse. s.l. : Menarini, 2008.

14. Greer JP, Arber DA, Glader B, et al. Wintrobe's clinical hematology. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2014.
15. Sistema BCS® XP - Manual de instruções, versão 1.3, Siemens Healthcare Diagnostics. 2008.
16. Capillarys Hemoglobin- The Capillarys 2 Flex Percing Sebia Operator's Manual. s.l. : SEBIA, 2014.
17. Norma da Direção-Geral da Saúde Nº. 18/2004 de 7/09/2004 -Prevenção das formas graves de hemoglobinopatia. Direção-Geral da Saúde [Internet] 2014 (citado em 18 de Outubro de 2015). Disponível em: <http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas>.
18. Manual de formación y referencia ORTHO AutoVue® Innova. s.l. : Ortho-Clinical Diagnostics, 2010.
19. Quinley ED. Immunohematology - Principles and Practice. s.l. : Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
20. Pesquisa de hemoglobina S. American Association for Clinical. Chemistry - [Citado em 21 de Outubro de 2015]. Disponível em: <http://labtestsonline.org/>.
21. Norma da Direção-Geral da Saúde Nº. 30/2013 atualizada 09/04/2015 - Abordagem, Diagnóstico e Tratamento da Ferropénia no Adulto. Direção-Geral da Saúde [Internet] (citado em 17 de Novembro de 2016). Disponível em: <http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas>.
22. Shrestha A and Karki S. Evaluation of EDTA induced pseud thrombocytopenia and the effect of alternative anticoagulants. Journal of Pathology of Nepal. 2014. 4(8):626-629.
23. ADVIA® 2400 Chemistry System – Guia do Operador, Revisão A, Siemens Healthcare Diagnostics, 2009.
24. Clinitek Atlas® – Manual de Operação, Edição Atlas Pro®, Siemens Healthcare Diagnostics, 2008.
25. Sysmex [Internet]. [Acedido a 26 de Novembro 2016]. Disponível em : <https://www.sysmex.com/la/pt/Pages/default.aspx>

26. SEBIA. CAPILLARYS PROTEIN-Instruções de uso. 2014.
27. Norma da Direção-Geral da Saúde Nº. 02/2011 de 14/01/2011 - Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. Direção-Geral da Saúde [Internet] (citado em 23 de Novembro de 2016). Disponível em: <http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas>
28. Microalbumin. American Association for Clinical. Chemistry.[Citado em 4 de dezembro de 2016]. Disponível em: <http://labtestsonline.org/>.
29. Renal panel. American Association for Clinical. Chemistry - [Citado em 6 de dezembro de 2016]. Disponível em: <http://labtestsonline.org/>.
30. Norma da Direção-Geral da Saúde Nº. 066/2011 actualizada a 26/02/2015 - Prescrição de Exames Laboratoriais para Avaliação de Dislipidemias no Adulto. Direção-Geral da Saúde [Internet] (citado em 23 de Novembro de 2016). Disponível em: <http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas>
31. Cardiac-risk. American Association for Clinical Chemistry.[Citado em 6 de dezembro de 2016]. Disponível em: <http://labtestsonline.org/>.
32. Silva D e Lacerda AP. Proteína C reativa de alta sensibilidade como biomarcador de risco na doença coronária. Rev Port Cardiol. 2012;31(11):733-745.
33. ADVIA Centaur® XP Immunoassay System – Guia do Operador, Revisão A, Bayer HealthCare, 2006.
34. Cobas e411 Compendium of Background Information, Version 1.0, Roche Diagnostics, 2006.
35. Valente C, Faria MJ, Trindade L, et al. Diagnóstico serológico de algumas doenças infecciosas. Acta Médica portuguesa. 1993.
36. Norma da Direção-Geral da Saúde Nº. 039/2011 actualizada a 26/12/2012 - Prescrição de Exames Laboratoriais para Avaliação e Monitorização da Função Tiroideia. Direção-Geral da Saúde [Internet] (citado em 4 de Novembro de 2016). Disponível em: <http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas>

37. Thyroid function. American Association for Clinical Chemistry [Citado em 6 de dezembro de 2016]. Disponível em: <http://labtestsonline.org/>
38. Phadia [Internet]. [Acedido a 26 de Novembro 2016]. Disponível em : <http://www.phadia.com/en/Products/Phadia-Laboratory-Systems/Phadia-250>
39. Norma da Direção-Geral da Saúde Nº. 061/2011 actualizada a 23/03/2015 - Prescrição de Exames Laboratoriais para Avaliação de Doença Alérgica. Direção-Geral da Saúde [Internet] (citado em 8 de Novembro de 2016). Disponível em: <http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas>
40. Perkinelmer [Internet]. [Acedido a 26 de Novembro 2016]. Disponível em: https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44131232BRO_FrontierFTIR.pdf
41. Torbet Laboratories. Pylobactell 100mg comprimido solúvel Ureia-13C. Bula de medicamento. 2014.
42. bioMérieux [Internet]. [Acedido a 30 de Novembro 2016]. Disponível em: <http://www.biomerieux-usa.com/clinical/vitek-2-healthcare>
43. bioMérieux [Internet]. [Acedido a 30 de Novembro 2016]. Disponível em: <http://www.biomerieux-usa.com/clinical/bact-alert-3d-healthcare>.
44. Biogen [Internet]. [Acedido a 29 de Novembro 2016]. Disponível em: <http://www.biogen-diagnostics.com/diana.html>. <http://www.biogen-diagnostics.com>.
45. Norma da Direção-Geral da Saúde Nº. 003/2014 actualizada a 06/11/2014 - Rastreio Oportunístico do Cancro do Cólon e Reto. Direção-Geral da Saúde [Internet] (citado em 8 de Novembro de 2016). Disponível em: <http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas>
46. bioMérieux [Internet]. [Acedido a 30 de Novembro 2016]. Disponível em: http://www.biomerieux.es/upload/Catálogo_bioMérieux_España_clínica_2016.pdf
47. Koneman, EW, Allen S, Procop G, e al. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas colorido. 6ª edição: MEDSI, 2012.
48. Manual de colheitas - Serviço de Patologia Clínica Centro Hospitalar Lisboa Norte. s.l. : 6ª Edição, 2014.

49. Brito F. Automação do exame de urina rotina: optimização da precisão e do tempo de análise. Boletim técnico- Laboratório Hermes Pardini. 2009.
50. Bottini PV e Garlipp CR. Urinálise: comparação entre microscopia óptica e citometria de fluxo. J Bras Patol Med Lab.2006; 42(3): 157-162.
51. Roriz JS, Vilar FC, Mota LM, et al.. Urinary tract infection. Medicina (Ribeirão Preto) 2010;43 (2): 118-25
52. Oliveira CAM e Elizabete M. Gestão da fase Analítica do Laboratório-Como assegurar a qualidade na prática. s.l. : Controlab, 2011.
53. Lario JVC e Julian BB. CONTROL DE LA CALIDAD INTERNO: UNA PRÁCTICA MUY ACTUAL. s.l. : SEQC, 2012.
54. Pimentel R. Controlo de qualidade: Uma ferramenta de validação. s.l. : Laboratório Dr. Joaquim Chaves, 2010.
55. Norma da Direção-Geral da Saúde Nº. 060/2011 actualizada a 01/08/2014 - Prescrição e Determinação do Antígeno Específico da Próstata - PSA. Direção-Geral da Saúde [Internet] (citado em 9 de Novembro de 2016). Disponível em: <http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas>